

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA

E.A.P. DE QUÍMICA

**Determinación de triptófano en harina de pescado
cromatografía líquida de alta resolución**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico

AUTOR

Gloria A. Cosco Salguero

ASESOR

Hector Gomez

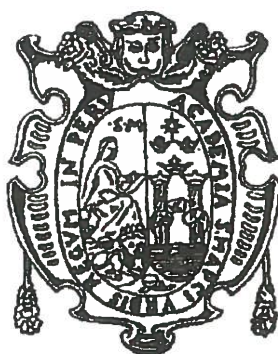
Lima - Perú

1999

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE QUÍMICA



**“DETERMINACIÓN DE TRIPTOFANO EN HARINA DE
PESCADO POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN”**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

QUÍMICO

PRESENTADO POR:

BACH. : GLORIA A. COSCO SALGUERO
ASESOR : Quím. HECTOR GOMEZ M. Sc.

Lima - Perú

1999

DEDICATORIA

A mis padres y hermana, quienes con su esfuerzo y apoyo han hecho posible mi formación profesional.

A mi asesor Quim. Hector Gomez, por brindarme su apoyo incondicional y desinteresado en la elaboración de esta tesis.

A la Sra. Quim. Rossi Choque, por confiar en mi como profesional y darme la confianza necesaria.

Mi mayor reconocimiento a los miembros del Jurado:

Presidente: Dr. Holger Maldonado Garcia

Miembro: Quim. Marco Guerrero Aquino

Miembro: Quim. Martha Bravo Ayala

San Marcos, 15 de enero de 1999

RESUMEN

Siendo la Harina de Pescado un producto de exportación que debe competir cada vez más con el producido por nuestros países vecinos, tenemos que disponer de un método que sea capaz de analizar el contenido nutricional de la Harina de Pescado sobre la base de su composición de aminoácidos (Tryptófano) además de preciso y rápido, por lo tanto la presente tesis ha obtenido las condiciones experimentales óptimas para el análisis de Tryptófano en Harina Pescado por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, tomando como referencia el método “Determinación de Tryptófano en Formulas Infantiles y medicamentos nutricionales” ⁽¹⁾

El marco teórico nos introduce en el desarrollo de un método cromatográfico, es muy importante que un investigador conozca que parámetros puede manejar para el desarrollo de una técnica; también hablamos sobre los tipos de enzimas proteolíticas esto es con el fin de ilustrarnos un poco acerca de la bioquímica, y ver que no estamos aislados con respecto a las otras ramas científicas.

La parte experimental presenta la curva de Tryptófano, se han evaluado parámetros como coeficiente de correlación que da 0,9999, que demuestra la linealidad en el rango de trabajo. Además expone los ensayos que hemos realizado para optimizar la digestión de la muestra, las variables a considerar son el tamaño de muestra, cantidad de enzima, tiempo de digestión y fase móvil adecuada para la muestra; así después de haber realizado el estudio se ha llegado a la conclusión que las mejores condiciones son:

Tiempo de digestión: 6 horas

Cantidad de enzima: 10 unidades

Cantidad de muestra: 50 mg

Estos ensayos se aprecian en gráficas que se encuentran en la parte experimental y nos permiten visualizar las variaciones de cada parámetro.

También hemos realizado ensayos para probar la repetibilidad del método obteniendo 0,73 g/100g M y una desviación estándar de 0, lo que nos muestra que es preciso; además tenemos ensayos de muestras con adiciones de estándar que presentan porcentajes de recuperación de 98,0 y 99,4%, que verifica su exactitud. Además se ha evaluado el límite de cuantificación el cual nos da 0,08 mg/100g de muestra.

INDICE

	Resumen	2
I.	Introducción	5
II.	Objetivo	6
III.	Marco teórico	
	Análisis conformacional del pescado	7
	Proteínas de pescado	7
	Enzimas proteolíticas. Clasificación	8
	Desarrollo de un método cromatográfico	10
	Elección de la fase móvil	10
	Elección de la fase estacionaria	11
	Elección de las dimensiones de la columna	13
	Elección del detector	15
	Detector de fluorescencia	15
	Efecto de la temperatura y el disolvente	15
	Efecto del PH	16
	Efecto de la concentración	16
	Atenuación del oxígeno	16
IV.	Parte Experimental	17
	Aparatos	17
	Reactivos	17
	Ensayos experimentales	18
V.	Datos obtenidos	20
VI.	Cálculos y resultados.	24
	Calculo de concentración de triptófano	24
	Curva de Trabajo del Triptófano	26

	Cálculos del tiempo de digestión	29
	Cálculos cantidad de enzima	30
	Cálculos cantidad de muestra	31
	Cálculos de la repetibilidad	32
	Cálculos de exactitud	33
	Cálculo de límite de cuantificación	34
	Gráfico I (Tiempo de digestión)	35
	Gráfico II (Cantidad de enzima)	36
	Gráfico III (Cantidad de muestra)	37
VII.	Discusión de resultados	38
VIII.	Conclusiones	40
IX.	Bibliografía	41
X	Anexo	
	Condiciones Cromatográficas	42

I. INTRODUCCION

El presente trabajo se ha realizado debido a la falta de una técnica libre de interferencias para la determinación de Triptófano, La adecuación se ha hecho porque la técnica original es para formulas infantiles y medicamentos nutricionales. Como es de conocimiento general casi todos los aminoácidos pueden ser analizados por hidrólisis ácida menos el Triptófano, incluso por hidrólisis básica se isomeriza, la forma más exacta para su determinación es la hidrólisis enzimática.

El marco teórico de este trabajo introduce al lector en el mundo de la cromatografía líquida práctica, sobre todo en los parámetros más importantes que se deben tener en cuenta al momento del desarrollo de un nuevo método, la parte experimental nos da el detalle de los ensayos que se han realizado para el ajuste de cada parámetro.

Las proteínas de origen animal, en este caso harina de pescado, suelen ser de calidad superior a las de origen vegetal, lo que puede demostrarse comparando el contenido de aminoácidos de las distintas proteínas con el patrón FAO, elegido para satisfacer adecuadamente las necesidades de los niños de corta edad.

Cuando la composición aminoacídica de la dieta difiere mucho de la ideal se habla de "desequilibrio aminoacídico" y puede llevar consigo una eficacia reducida de la utilización de los aminoácidos; se desarrolla una dermatitis escamosa y pigmentada en las zonas expuestas al sol. En función al tipo de vestiduras que se utilicen y de las superficies cutáneas expuestas, las zonas más afectas suelen ser: rostro, cuello, dorso de las manos, un retraso del crecimiento y/o un deterioro permanente de la capacidad mental de los niños.

La suplementación excesiva puede conducir al "antagonismo aminoacídico" e incluso producir efectos tóxicos. El antagonismo da como resultado un incremento de las necesidades de algunos aminoácidos, por haber aumentado el nivel de otros en la dieta. Así, por ejemplo, un consumo de leucina muy en exceso de las necesidades (como puede ocurrir al alimentar con sorgo y maíz a los pollos) deprime la utilización de triptófano e isoleucina y aumento, por consiguiente, las necesidades de estos aminoácidos.

Un elevado exceso de metionina, cisteína, tirosina, triptófano e histamina inhibe el crecimiento, reduce el consumo de alimentos y genera determinadas condiciones patológicas en los animales.

II. OBJETIVOS

- Encontrar las condiciones óptimas de: cantidad de enzima, tiempo de digestión y cantidad de muestra para la determinación de triptófano en la harina de pescado.
- Evaluar su precisión a través de la repetibilidad, exactitud a través de los porcentajes de recuperación y límite de cuantificación.
- Buscar una alternativa en la determinación de triptófano, ya que este aminoácido no puede ser tratado por hidrólisis ácida.

III. MARCO TEORICO

ANÁLISIS CONFORMACIONAL DEL PESCADO

Calidad de la proteína

Los tratamientos térmicos en presencia de oxígeno causan la destrucción parcial de los restos de triptófano de las proteínas. Tanto el triptófano libre, como el que está formando parte de las proteínas, se oxida a formilquinurenina en presencia de periodato sódico u ozono o por foto oxidación en presencia de riboflavina. . El triptófano también se oxida en presencia de peróxido de hidrógeno, pudiéndose detectar por cromatografía líquida tres o cuatro derivados más polares que el triptófano, que absorben a 278nm. ⁽²⁾

Características de Triptófano:

D,L – Cristales blancos, algo solubles en agua, estable en soluciones alcalinas, se descompone en ácidos fuertes. •

D(+) – Sabor dulce, punto de fusión 275 – 290 °C , soluble en agua, alcohol caliente e hidróxidos alcalinos, insoluble en cloroformo.

L(-) – Insípido, otras características idem. D(+) ⁽¹⁰⁾

Proteínas de Pescado

- Estructurales (70 - 80%) : Miocina - Actina - Actomiosina - Tropomiosina
Actinina - Troponina
- Tejido conjuntivo (2 a 3%) : Colágeno
- Proteínas sarcoplasmáticas (20 - 30%) : Mioglobulinas - Globulinas – Albúminas
Diversas enzimas.

ENZIMAS PROTEOLITICAS

Se consideran dos grupos, las peptidasas (exopeptidasa), que escinden secuencialmente los aminoácidos o péptidos a partir de un extremo y las proteasas que atacan las cadenas peptídicas en los enlaces no terminales. Una nueva subdivisión se funda en los grupos existentes en el centro activo. A continuación:

1.- Serin - proteasas.

Se trata de un grupo de enzimas cuya actividad se halla entre pH 7 – 11, por lo que también se denominan proteasas alcalinas. Enzimas de animales típicas son la tripsina, quimotripsina, elastasa, plasmina y trombina. Muchas bacterias y hongos producen serin proteasas. Por ejemplo, *Bacillus cereus*, *B. Firmus*, *B. Licheniformis*, *B. Megaterium*, *B. Subtilis*, *Serratia marcescens*, *Streptomyces fradiae*, *S. Griseus*, *Tritirachium album*, *Aspergillus flavus*, *A. Oryzae*, *A. Sojae*. En el centro activo de esta enzima existen juntos un resto de serina y un resto histidina, La escisión de la proteína ocurre con formación intermedia de una acilenzima.

Su inactivación puede efectuarse con reactivos tales como diisopropilfluorofosfato (DIFP) y fluorofenilmetansulfonilo(PMSF) que acilan de modo irreversible el resto serina activo.

La inhibición irreversible ocurre también con metilcetonas halogenadas que son análogos del sustrato que alquilan el resto histidina activo y por inhibidores de las proteasas, que son proteínas, que forman con la enzima un complejo inactivo que se encuentran ampliamente distribuidos en los órganos de animales y vegetales (páncreas, calostro, clara de huevo, patata, semillas de muchas leguminosas).

La especificidad de la serin proteasas es muy diversa. En tanto que la tripsina solamente rompe enlaces de restos de aminoácidos con cadenas laterales básicas (enlaces lisilo, argililo) y la quimotripsina preferentemente restos de aminoácidos con cadenas laterales aromáticas (fenilalanilo, tirosilo, triptofanilo), los enzimas microbianos son en general muy poco específicos.

2.- Tiol - Proteasas

Representantes típicos de este grupo son la papaina (de la papaya) (*Carica papaya*), bromelaina (del jugo y tallos del *Ananas comosus*), ficina (del *Ficus latex* y otros *Ficus spp.*), así como las proteasas de estreptococos. La zona de actividad de

esta enzima es muy amplia y se encuentra, dependiendo del sustrato, a pH 4,5 – 10 con un máximo a pH 6 – 7,5.

El mecanismo de acción es análogo al de las serin-proteasas. En el centro activo existe un resto cisteína. Por unión covalente se forma un tioéster intermedio. Estas enzimas son muy sensibles a la oxidación. Actúan, en general, en presencia de agentes reductores (por ejemplo, cisteína) y formadores de complejos (por ejemplo, EDTA). Su especificidad no es muy estricta.

3.- Metallo – proteasas.

A este grupo pertenecen tanto exopeptidasas como carbopeptidasas A y B, aminopeptidasas, dipeptidasas, prolidasa y prolinasa, así como también proteasa de bacterias y hongos, tales como *Bacillus cereus*, *B. Megaterium*, *B. Subtilis*, *B. Thermoproteolyticus* (termolisina), *Streptomyces griseus* (Pronasa; también contiene carboxi y aminopeptidasas), *Aspergillus oryzae*.

Estas enzimas contienen un mol de Zn^{+2} por mol de proteína; la prolidasa y prolinasa un mol de Mn^{+2} . En la carbopeptidasa A el ión metálico actúa como un ácido de Lewis, estableciendo contacto con el grupo carbonilo del enlace péptido que se va a escindir. La disposición de los otros restos participantes del centro activo, ha sido estudiada por análisis estructural con rayos X del complejo enzima-sustrato.

Las enzimas son activos en las zonas pH 6 – 9 ; la especificidad de estas proteasas es en general pequeño. El grupo es inhibido por formadores de complejos (EDTA) y por dodecilsulfato sódico

4.- Carboxil-proteasas (Proteasa ácidas)

Representantes típicos de este grupo son las enzimas animales pepsina y renina (enzima-lab), que actúan a pH 2 – 4, así como la catepsina D, que según el sustrato y origen tiene un pH óptimo entre 3 y 5. A pH 6-7 la renina escinde con mayor especificidad un enlace de la k-caseína y desencadena con ello la coagulación de la leche.

Las proteasas ácidas de los microorganismos se pueden dividir en enzimas tipo pepsina y tipo renina con acción coagulante de la leche. Las primeras son producidas, por ejemplo, por *Aspergillus usarii* y *Mucor spp.*, así como *M. Pusillus*.

En el centro activo de estas enzimas existen dos grupos carbonilo, de los cuales uno no está disociado.

La inhibición se consigue con diversos ésteres de diazoacetilaminoácidos, que reaccionan con el grupo carbonilo del centro activo, así como por pepstatina que es una mezcla de péptidos de diversos estreptomicetos con la fórmula general (R: ácido i-valeriano o ácido n-caproico; AHMHA: ácido 4 – amino – 3 – hidroxí – 6 – metil – heptanoico).⁽⁹⁾

DESARROLLO DE UN METODO CROMATOGRAFICO

1.- Elección de la fase móvil

En cromatografía líquida muchas separaciones requieren el uso de fases móviles de dos o más componentes. . Además el tipo de cromatografía elegido y los detectores disponibles imponen ciertas condiciones en la selección de los líquidos que han de utilizarse en la composición de la fase móvil. La fase móvil no debe ser un líquido en el cual sea totalmente insoluble la muestra a analizar. Por tanto el procedimiento sistemático de selección debe empezar por la determinación de la solubilidad de la muestra en varios de los disolventes normalmente usados. Esta evaluación de las solubilidades es esencial para evitar una fase móvil que pueda precipitar en el instrumento toda la muestra o parte de ella. La evaluación no resulta completa si no se ensaya también la estabilidad de la muestra en el disolvente cromatográfico. Resulta mucho menos costoso observar la posible inestabilidad de estas soluciones iniciales de la muestra en los viales que conocer el problema posteriormente a través de columnas estropeadas o cromatografías inestables.

Cantidad de muestra:

Si el objetivo es la cromatografía preparativa, con las correspondientes cantidades mayores de muestra, automáticamente se restringe la elección del tipo de cromatografía a utilizar, debido fundamentalmente a las limitaciones del disolvente. Los líquidos utilizados con mayor frecuencia en la cromatografía líquida en fase inversa son tetrahidrofurano, acetonitrilo o metanol mezclados con agua. En general estos disolventes se sobrecargan fácilmente con la muestra y los análisis se efectúan normalmente en el límite de solubilidad de la muestra en la fase móvil. Por tanto, se evita el uso de la cromatografía en fase inversa para el trabajo preparativo y se prefiere la cromatografía de adsorción.

Influencia del detector:

La selección de la fase móvil también depende de algunas consideraciones relacionadas con el detector, como el intervalo espectral de transparencia del disolvente y la longitud de onda de máxima absorción del compuesto. Si el disolvente que inicialmente se pensaba utilizar enmascara la absorción del compuesto, se debe emplear otro disolvente.

Pureza:

En cromatografía líquida es importante que tanto la disolución de la muestra como los disolventes de la fase móvil sean líquidos puros, libres de cualquier partícula sólida. Por tanto hay que filtrar la muestra antes de su inyección en el cromatógrafo. También se deben filtrar los disolventes utilizados en la fase móvil a través del mismo tipo de filtro que el empleado para la muestra.

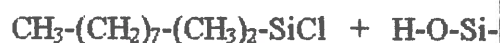
2.- Elección de la Fase Estacionaria:

La cromatografía de adsorción líquido-sólido, en fase reversa, se lleva a cabo normalmente utilizando como soporte gel de sílice con fases enlazadas, primero describiremos la fase estacionaria.

Fase Estacionaria:

Formado por partículas completamente porosas o de bolas de vidrio esféricas que están recubiertas por una delgada capa superficial de gel de sílice distribuida regularmente. La superficie del gel de sílice de cualquier tipo está recubierta de grupos Si-OH y Si-O-Si que pueden interaccionar con las moléculas de la muestra. En la superficie del gel de sílice hay dos tipos de hidroxilos: los hidroxilos libres (OH) con niveles de energías de unas 7 Kcal/mol, y los hidroxilos reactivos (dos grupos hidroxilos consecutivos enlazados por puentes de hidrógeno), que presentan una energía enlazante de unas 13 Kcal/mol.

Para la cromatografía líquida de fase reversa se preparan la fase estacionaria por reacción de los grupos Si-OH situados en la superficie de las partículas del soporte con diversos reactivos, por ejemplo:



Fase Estacionaria



Los rellenos de fase enlazada en cromatografía de fase inversa resultan muy útiles con muestras insolubles o moderadamente insolubles en agua. Las columnas de octadecilsilano son probablemente las de mayor uso, si bien pueden sustituirse eventualmente por columnas de fase enlazada que tengan una cadena alquílica más corta y más flexible, como el tipo C-8 o RP-8, que contienen grupos octilsililo. Si bien ambas fases contienen grupos alquilo, existen diferencias entre ellas, existiendo acuerdo general en que las cadenas cortas (Octilo) ofrecen una mayor selectividad frente a compuestos moderadamente polares, en tanto que las fases ODS deben utilizarse fundamentalmente para muestras apolares (lipofílicas).

Las cadenas más largas originan rellenos que muestran una mayor retención, además una mayor longitud de la cadena permite una mayor cantidad de muestra.

Efecto del aumento de la temperatura en la columna:

- Disminuye la viscosidad de la fase móvil y lograr así presiones menores y aumento de la transferencia de masa.
- Aumenta la solubilidad de la muestra en la fase enlazada y obtener así una mayor eficacia global de equipo, permitiendo la introducción de una cantidad de muestra adecuada.
- Aumenta la velocidad de migración iónica en los sistemas de intercambio iónico, con lo que se obtiene una mayor frecuencia de intercambio por unidad de longitud de la columna, y por tanto un mayor intercambio.

En muchos casos es conveniente el control de la temperatura debido a que en algunas columnas la eficacia puede variar con muy pequeños cambios de temperatura de 2 a 4 °C

De acuerdo a la técnica cromatográfica al disminuir el tamaño de la partícula aumenta la velocidad de intercambio entre las fases móvil y estacionaria de manera que se puedan conseguir eficacias suficientemente buenas.

El efecto del tamaño de las partículas se visualiza, las partículas grandes dejan espacios relativamente grandes entre ellas. Unas moléculas de la muestra pasan

rápida a través de los espacios vacíos mientras otras son retenidas en las partículas. El resultado es el ensanchamiento del pico. Partículas pequeñas rellenan de manera más compacta y los volúmenes vacíos son mucho menores con el consiguiente aumento de la eficacia.

El peligro de usar partículas demasiado pequeñas es, naturalmente, que las columnas pueden quedar rellenas de manera tan compacta que el líquido no puede ser bombeado.

3.- Elección de las Dimensiones de la Columna:

Las dimensiones variables en una columna son el diámetro y la longitud.

Diámetro de la columna:

La elección del diámetro de la columna dependerá de la concentración de un componente en el efluente y del volumen de fase móvil que debe consumirse en un análisis, todo lo cual puede relacionarse con el caudal o, más correctamente, con la velocidad de la fase móvil. Como se discutió anteriormente en relación con la teoría cromatográfica, el proceso cromatográfico es función de la velocidad lineal de la fase móvil, es decir, la velocidad a la cual pasa a través de la columna. Diversos parámetros cromatográficos, como eficacia y presión de la columna, tiempo de retención y resolución, son función de esta velocidad lineal. La propia velocidad lineal de la fase móvil es función del caudal volumétrico (mL/min) de la fase móvil y del diámetro de la columna. Así, si una columna de 2,6 mm de diámetro interno necesita, para una velocidad lineal de 1 mm/seg, un caudal de 0,64 mL/min, otra de 4,6 mm de diámetro interno necesitará 1,99 mL/min, un caudal triple que el anterior. Si hay que considerar el costo del disolvente, es preferible la columna de 2,6 mm.

De modo similar, el volumen de fase móvil en el que se eluye un componente (es decir, el volumen de disolvente que contiene el componente o pico) será tres veces mayor en la columna de 4,6 mm respecto a la de 2,6 mm. Si una consideración importante a tener en cuenta es precisamente la sensibilidad, como en el caso de análisis de trazas, los componentes deberán eluirse en el mínimo volumen de disolvente posible, Por ello será preferible de nuevo la columna de 2,6 mm.

Cuando son muy pequeños diámetros origina una disminución de la eficacia. La razón no es teórica sino que está relacionada con la tecnología del relleno.

Longitud de la columna:

Normalmente se usan columnas de 25 cm de longitud, si se requiere un número de platos teóricos mayor de los que se pueden proporcionar estas columnas, se conectan en serie dos o más de ellas. La principal razón por la que se prefiere esta forma de ensamblado está relacionada con la técnica de llenado de las columnas, ya que resulta mucho más difícil preparar columnas largas de alta eficacia. Por tanto, dos o más columnas cortas conectadas adecuadamente en serie tendrán una eficacia conjunta superior a la de una única columna de longitud equivalente.

Manejo de las columnas:

Aunque no está relacionado directamente con el desarrollo de un método de cromatografía líquida, el método adecuado para el manejo de las columnas de separación es una cuestión importante que debe tener en cuenta todo cromatografista experimental; por lo que se incluyen algunas recomendaciones al respecto.

Hay que asegurarse siempre que el flujo de la fase móvil vaya en dirección indicada en la columna. Generalmente no es recomendable usar las columnas de cromatografía líquida, en particular las de fase enlazada, durante largos periodos de tiempo a temperaturas superior a 80 °C.

Antes de desconectar el instrumento de cromatografía líquida siempre hay que enfriar la columna hasta temperatura ambiente con flujo de fase móvil. Si se detiene el flujo a temperaturas altas la eficacia de la columna puede disminuir. También hay que evitar siempre que sea posible una disminución brusca de la presión de las columnas, tanto durante el trabajo como al detener el flujo, ya que da lugar a un flujo en la columna en sentido inverso.

Siempre que no esté utilizando la columna hay que colocar los tapones en los extremos para evitar que se seque.

4.- Elección del detector

El detector de uso más corriente es esencialmente un espectrofotómetro UV que puede trabajar a una longitud fija o bien permitir la selección de la longitud de onda dentro de un intervalo determinado. Si se conocen las propiedades de los compuestos a separar, la elección del detector y de la longitud de onda resulta relativamente sencilla. Los detectores de longitud de onda variable así como los de índice de refracción pueden presentar limitaciones respecto a los líquidos que pueden utilizarse como fase móvil en este intervalo de longitudes de onda. Otro punto a tener en cuenta es la sensibilidad que se necesita. Si no se puede concentrar la muestra adecuadamente antes de la elución, puede ser preciso trabajar con detectores de máxima sensibilidad, como los espectrofotómetros de fluorescencia, otros detectores utilizados algunas veces cuando se requiere gran sensibilidad es el detector electroquímico. ⑥

DETECTOR DE FLUORESCENCIA

Es probablemente el más sensible de todos los detectores de cromatografía líquida por lo tanto es usado frecuentemente para análisis de trazas. Cuando los compuestos que poseen determinados grupos funcionales específicos se excitan con energía de ciertas longitudes de onda (cortas) y emiten radiación de mayores longitudes de onda. Normalmente la emisión se determina en dirección perpendicular a la excitación, y naturalmente la capacidad real de fluorescencia de grupos químicos específicos es función de las longitudes de onda de la excitación y de la emisión. ⑥

El detector es muy sensible a veces su respuesta es lineal sobre un rango de concentración limitado. En efecto, para trabajos exactos, el detector no puede ser asumido lineal sobre un rango de concentración de más de dos ordenes de magnitud.

Otra desventaja de este detector es que la mayoría de sustancias no tienen fluorescencia natural y los derivados fluorescentes deben ser sintetizados para ser detectados. ⑥

1.- Efecto de la Temperatura y el disolvente:

La eficacia cuántica de la fluorescencia disminuye en muchas moléculas con el aumento de la temperatura, ya que el aumento de la frecuencia de las colisiones a temperatura elevada hace aumentar la probabilidad de desactivación por conversión

externa. Una disminución en la viscosidad del disolvente también aumenta la probabilidad de conversión externa y produce el mismo resultado.

La fluorescencia en una molécula disminuye en presencia de disolventes que contienen átomos pesados o de solutos con tales átomos en su estructura; por ejemplo tetrabromuro de carbono y el yoduro de etilo. El efecto es similar al que tiene lugar cuando se introducen átomos pesados en compuestos fluorescentes; las interacciones orbital spin desembocan en un aumento de la velocidad de formación del triplete y una correspondiente disminución de la fluorescencia. ⁽⁸⁾

2.- Efecto del PH:

El espectro de fluorescencia de compuestos aromáticos ionizables, estos contienen grupos funcionales ácidos o básicos, son críticos dependen del pH y de los enlaces puente de hidrógeno con las moléculas del solvente. Controlar exactamente el pH de la elución es importante para trabajar con estos tipos de compuestos.

3.- Concentración:

En el análisis de fluorescencia la intensidad de la luz emitida es proporcional a la concentración de la fluorescencia en el rango de trabajo. Sin embargo, a altas concentraciones la relación llega a ser no lineal ocasionado por el efecto de filtro interno. Este fenómeno es ocasionado por la reabsorción de luz emitida por su fluorescencia o por otros compuestos que pueden estar presentes. La no-linealidad también puede ocurrir cuando la concentración de la fluorescencia es tal que el haz de excitación es absorbido antes que llegue al centro de la celda.

4.- Atenuación del oxígeno:

La atenuación de la fluorescencia por la molécula de oxígeno puede ser un problema si los solventes no han sido degasificados. Esto es esencial, por lo cual, los solventes deben ser degasificados y mantenerse bajo una atmósfera de helio para prevenir la absorción de oxígeno del aire. ⁽⁹⁾

Esto se produce como consecuencia de las propiedades paramagnéticas del oxígeno molecular, el cual provoca cruzamientos entre sistemas y conversiones de las moléculas excitadas al estado triplete. Otras especies paramagnéticas también tienden a atenuar la fluorescencia. ⁽⁷⁾

IV. PARTE EXPERIMENTAL

Aparatos:

- Cromatógrafo Líquido - Loop 50 ul - Bomba Perkin Elmer Modelo 250, Horno para columna SSI Modelo 505, Detector de fluorescencia Modelo 240, Estación de colección de datos PE Nelson Modelo 1020.
- Columna cromatográfica C-8 (Octil silano) Marca Waters (3,9mm x 150 mm)
- Baño María con temperatura.
- Membrana 0,45 um.
- Potenciómetro
- Balanza analítica
- Bomba de vacío

Reactivos:

- Acetonitrilo grado HPLC - Metanol HPLC.
- Agua bidestilada
- Acido fosfórico 85%
- Fosfato monobásico de sodio.
- Estándar L - Triptófano. % P = 98% (Cód. LAA-21, Cat. SIGMA)
- 5 - Metil - D,L- Triptófano. %P =100% (Cód. M0534, Cat. SIGMA)
- Pronasa. (Cód. P5146, Cat. SIGMA)
- Tris (hidroximetil) aminometano (TRIZMA)
- Acido clorhídrico 1N

Materiales:

- Frascos de 20 ml con tapa
- Fiolas de 10, 50, 100 , 200, 1000 mL
- Pipeta volumétrica de 1, 3, 5 , 10 mL
- Pipeta graduada 5, 10 mL
- Micropipeta 100 – 1000 uL
- Vasos de 250, 1000 mL
- Equipo de filtración.
- Baguetas.

Preparación de soluciones:

- 1.- Buffer de digestión : Disolver 6,06g de trizma en aproximadamente 850mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8.5 con ácido clorhídrico 1.0 N. Diluir a 1 L con agua destilada.
- 2.- Solución stock de pronasa: Disolver 0.2000g y llevar a 50 mL con el buffer de digestión. (Evitar la formación de espuma_no agitar).
- 3.- Solución stock estándar interno : Disolver 0.4000g de 5-metil-D,L-triptofano con agua destilada, hasta un volumen final de 500 mL
- 4.- Solución stock de triptófano: Disolver 0.1000g de triptofano en agua destilada y diluir a 1 L.
- 5.- Soluciones estándar de trabajo : Preparar 5 soluciones estándar en fioles de 50 mL. A cada fiola adicionar 0.5mL de estándar interno y 10 mL de solvente seguidamente adicionar a cada fiola 1mL, 6mL, 10mL, 16mL y 20 mL a cada fiola respectivamente. Diluir a 50 ml con agua destilada.
- 6.- Fase móvil: Disolver 13,8000 g de fosfato monobásico de sodio in 2 L de agua que contengan 7 ml de ácido fosfórico y agitar.
Filtrar a través de filtro 0,45 um. Colocar en el reservorio del cromatógrafo.

Ensayos experimentales para la obtención de los parámetros óptimos para la determinación del triptofano:

De acuerdo con la técnica hemos realizado una optimización de la digestión de la enzima, para lo cual se efectuaron los siguientes ensayos:

- Cantidad de enzima, este ensayo se realizó porque estamos tratando con otra matriz.
Peso de muestra 0,0500g .
Ensayos por duplicado.

2 unidades	-----	0,100 mL
5 unidades	-----	0,250 mL
10 unidades	-----	0,500 mL
15 unidades	-----	0,750 mL
20 unidades	-----	1,000 mL

- **Tamaño de muestra**

Ensayos por duplicado.

Ensayos: 30mg - 40mg - 50 mg - 60 mg - 70 mg

- **Tiempo de digestión, se han realizado estos ensayos porque se trata de otra matriz.**

Peso de muestra 0,0500g.

Ensayos por duplicado.

Ensayos (4, 6, 8 y 10 horas)

- **Modificación de la fase móvil.**

Buffer = Fosfato monobásico de sodio pH = 2.1

Fase Móvil: (Acetonitrilo:Buffer) (10 : 90)

V. DATOS OBTENIDOS

Datos que generan la curva para el ensayo cantidad de muestra, repetibilidad y límite de cuantificación:

TABLA N ° 1

Conc. TRP(ug/ml)	AREA TRP	AREA 5 - MT
2	5460813	47734948
2	5273466	48155196
6	16032790	49349956
6	15685609	49292648
10	26013242	49657908
10	26250094	49280204
16	41945804	49339176
16	41784812	49206640
20	52210704	50159500
20	51934352	50238904

Datos que genera la curva para el ensayo tiempo de digestión y cantidad de enzima:

TABLA N ° 2

Conc. TRP(ug/ml)	AREA TRP	AREA 5-MT
2	6740967	58524804
6	18987474	59472748
10	31541322	59373344
16	50693164	59458048
20	62847992	59721348

Datos que generan la curva para la evaluación de la exactitud:

TABLA N ° 3

Conc. TRP(ug/ml)	AREA TRP	AREA 5-MT
2	4726080	40289088
10	21676356	40506900
20	43205964	38444620

Datos para evaluar el tiempo de digestión:

TABLA N ° 4

TIEMPO DE DIGESTION	AREA TRP	AREA 5 - MT
Bk 10 unidades	2824547	62459688
4 horas	22461536	61381180
4 horas	22369296	61231360
6 horas	23904778	60089328
6 horas	23769968	60054264
8 horas	23378988	60495912
8 horas	22722556	61168216
10 horas	23179982	61036696
10 horas	22618036	61494832

Datos para evaluar cantidad de enzima:

TABLA N ° 5

CANTIDAD DE ENZIMA	AREA TRP	AREA 5 - MT
Bk - 2 unidades	685691	63638844
M - 2 unidades	14983934	61435816
M - 2 unidades	14931316	60859816
Bk - 5 unidades	1533677	62608768
M - 5 unidades	21054974	60626216
M - 5 unidades	20227644	60868480
Bk -10 unidades	2824547	62459688
M - 10 unidades	23904778	60089328
M - 10 unidades	23769968	60054264
Bk -15 unidades	4232729	62222764
M - 15 unidades	26334858	60177712
M - 15 unidades	25826188	60155776
Bk-20 unidades	5044001	61961424
M - 20 unidades	28176874	59615896
M - 20 unidades	27754884	59876056

Datos para evaluar la cantidad de muestra :

TABLA No 6

CANTIDAD DE MUESTRA	AREA TRP	AREA 5 - MT
Bk-10 unidades	2099161	50237528
30 mg	13521884	48948100
30 mg	13272443	49529796
40 mg	16742987	48531752
40 mg	17085944	48339256
50 mg	19927906	48381904
50 mg	19684068	47075880
60 mg	22957006	47071236
60 mg	23036200	46842488
70 mg	26643942	47523560
70 mg	26419732	47727716

Datos para evaluar la repetibilidad:

TABLA No 7

MUESTRA	AREA TRP	AREA 5 - MT
Bk-10 unidades	2099161	50237528
M - 1	19849780	47178780
M - 2	19915338	46693948
M - 3	19902654	46957824
M - 4	20020424	47023948
M - 5	19815936	46597176
M - 6	20036046	47624152
M - 7	20087602	47233584

Datos para evaluar límite de cuantificación:

TABLA No 8

BLANCO (Bk)	AREA TRP	AREA 5 - MT
Bk-10 unidades	2099161	50237528
Bk-10 unidades	2117539	49624416
Bk-10 unidades	2087833	49581796
Bk-10 unidades	2070203	50006300
Bk-10 unidades	2120512	49096832

Datos para evaluar la exactitud:

TABLA No 9

MUESTRA	AREA TRP	AREA 5 - MT
Bk-10 unidades	2099161	50237528
M - 1	16762784	42262100
M - 2	16900872	42037336
M - 1*	17826020	41766032
M - 2*	19054184	42182564

VI. CALCULOS Y RESULTADOS

CALCULO DEL CONTENIDO DE TRIPTÓFANO EN HARINA DE PESCADO

TRP = Area pico de triptófano

5 - MT = Area pico del standard interno

R = Factor respuesta (pendiente de la curva de estándares)

SI = Concentración (ug/mL) estándar interno en la muestra

M = Masa de la muestra (g)

Ecuación:

$$\text{mg TRP} / 100 \text{ g} = \frac{\text{TRP} / 5\text{-MT}}{R} \times \frac{\text{SI}}{M} \times 0,05\text{L} \times 100$$

Cálculo de la concentración del Estándar Interno (5-MT) en la muestra :

Concentración inicial :

$$\begin{array}{rcl} 0,0008 \text{ g} & \text{-----} & 1,0 \text{ mL} \\ x & \text{-----} & 0,5 \text{ mL} \end{array}$$

$$x = 0,0004 \text{ g en } 50 \text{ mL}$$

$$\frac{0,000008 \text{ g}}{\text{mL}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \times \frac{1000 \text{ ug}}{1 \text{ mg}} = 8 \text{ ug/mL}$$

Cálculo del peso de la muestra:

Debe ser entre 50 a 700 ug Triptófano. La harina de pescado tiene aproximadamente 0,70% de triptófano

Ejemplo de cálculo:

$$\begin{array}{rcl} 0.7 \text{ g Trp} & \text{-----} & 100 \text{ g Muestra} \\ 5,0 \times 10^{-5} \text{ g Trp} & \text{-----} & X \text{ Muestra} \end{array}$$

$$X = 0,007 \text{ g Muestra}$$

Entonces se debe pesar entre 0,007g - 0,1 g de Harina de pescado.

Cálculo de la adición:

Se agrega a cada muestra 0,25 mL de la solución de 100 mg/L de Triptófano

$$\begin{array}{rcl} 100 \text{ mg} & \text{-----} & 1000 \text{ mL} \\ x \text{ mg} & \text{-----} & 0,25 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = 0,025 \text{ mg Triptófano}$$

El cálculo es para 100 g de muestra, entonces:

$$\begin{array}{rcl} 0,025 \text{ mg} & \text{-----} & 0,05 \text{ g Muestra} \\ X \text{ mg} & \text{-----} & 100 \text{ g Muestra} \end{array}$$

La adición es 50 mg en 100g de muestra

DATOS QUE GENERAN LA CURVA DE TRABAJO DE TRIPTÓFANO

TABLA No 9

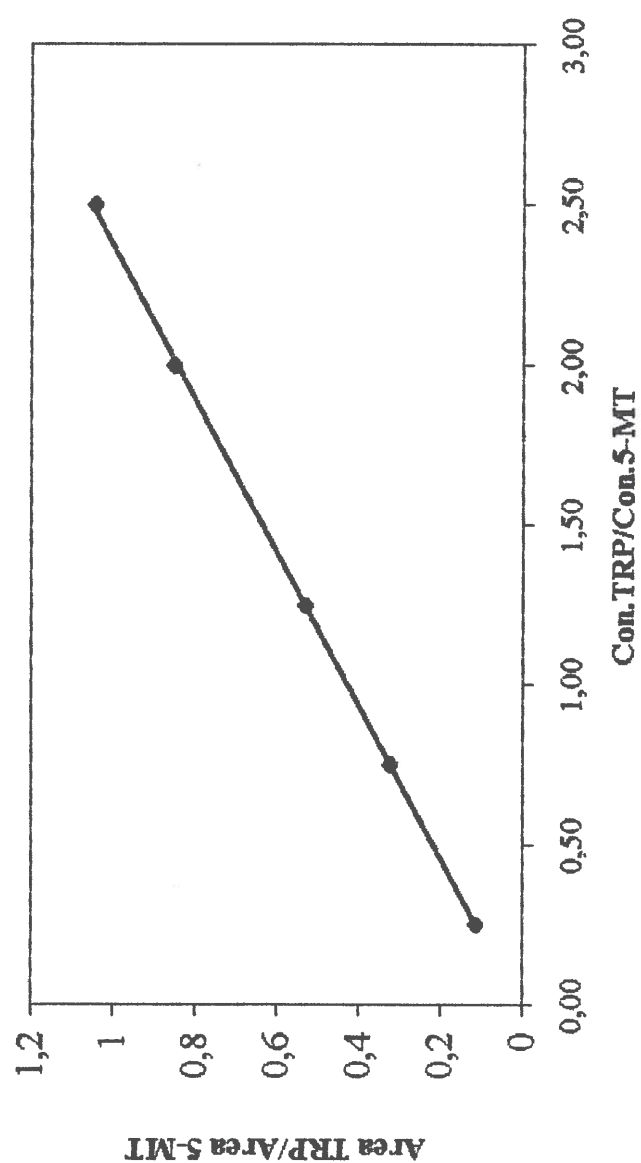
Cálculos de datos de la tabla N° 1 (Sección V):

Con. TRP(ug/ml)	AREA TRP	AREA 5 - MT	AREA TRP	AREA 5 - MT
2	5460813	47734948	5367140	47945072
2	5273466	48155196		
6	16032790	49349956	15859200	49321302
6	15685609	49292648		
10	26013242	49657908	26131668	49469056
10	26250094	49280204		
16	41945804	49339176	41865308	49272908
16	41784812	49206640		
20	52210704	50159500	52182076	49965186
20	52153448	49770872		

Con. TRP/Con.5-MT	AREA TRP / AREA 5-MT
0,25	0,111943507
0,75	0,321548679
1,25	0,528242706
2,00	0,849661806
2,50	1,044368693

m = 0,416364763
r = 0,9999
R = m

**CURVA PARA LA DETERMINACION DE TRIPTÓFANO POR
EL METODO DEL ESTANDAR INTERNO**



$m = 0,416364763$
 $b = 0,009060649$
 $r = 0,99999$

TABLA No 10

Cálculos de datos de la tabla N ° 2 (Sección V):

Conc. TRP(ug/ml)	AREA TRP	AREA 5-MT
2	6740967	58524804
6	18987474	59472748
10	31541322	59373344
16	50693164	59458048
20	62847992	59721348

Con. TRP/Con. 5-MT	AREA TRP / AREA 5-MT
0,25	0,115181368
0,75	0,319263438
1,25	0,531237082
2,00	0,852587088
2,50	1,052353875

$$m = 0,41894956$$

$$r = 0,9999$$

$$R = m$$

TABLA No 11

Cálculos de datos de la tabla N ° 3 (Sección V):

Conc. TRP(ug/ml)	AREA TRP	AREA 5-MT
2	4726080	40289088
10	21676356	40506900
20	43205964	38444620

Con. TRP/Con. 5-MT	Area TRP/Area 5-MT
0,25	0,117304219
1,25	0,535127497
2,5	1,123849423

$$m = 0,448321625$$

$$r = 0,9994$$

$$R = m$$

CALCULOS (TIEMPO DE DIGESTION) TABLA N° 12

Cantidad de muestra = 0,0500g

Cantidad de enzima = 10 unidades

TIEMPO (Horas) DE DIGESTION	AREA TRP	AREA 5 - MT	mgTRP/100g M	gTRP/100gM	PROMEDIO
Bk_ 10 unidades	2824547	62459688	86,4	-	-
4h	22461536	61381180	612,4	0,61	0,61
4h	22369296	61231360	611,2	0,61	-
Bk_ 10 unidades	2824547	62459688	86,4	-	-
6h	23904778	60089328	673,3	0,67	0,67
6h	23769968	60054264	669,5	0,67	-
Bk_ 10 unidades	2824547	62459688	86,4	-	-
8h	23378988	60495912	651,6	0,65	0,64
8h	22722556	61168216	623,0	0,62	-
Bk_ 10 unidades	2824547	62459688	86,4	-	-
10h	23179982	61036696	638,8	0,64	0,63
10h	22618036	61494832	616,0	0,62	-

Para hacer los cálculos se utiliza el valor R de la tabla N° 10

CALCULOS (CANTIDAD DE ENZIMA) TABLA N° 13

Cantidad de muestra = 0,0500g
Tiempo de digestión = 6 horas

ENZIMA (Unidad)	AREA TRP	AREA 5 - MT	mgTRP/100gM	g/100gM	PROMEDIO
Bk - 2 unidades	685691	63638944	20,6	-	-
M - 2 unidades	14983934	61435816	445,2	0,45	0,46
M - 2 unidades	14931316	60859816	468,5	0,47	-
Bk - 5 unidades	1533677	62608768	46,8	-	-
M - 5 unidades	21054974	60626216	616,4	0,62	0,60
M - 5 unidades	20227644	60868480	587,8	0,59	-
Bk-10 unidades	2824547	62459688	86,4	-	-
M - 10 unidades	23904778	60089328	673,3	0,67	0,67
M - 10 unidades	23769968	60054264	669,5	0,67	-
Bk-15 unidades	4232729	62222764	129,9	-	-
M - 15 unidades	26334858	60177712	705,8	0,71	0,70
M - 15 unidades	25826188	60155776	689,9	0,69	-
Bk-20 unidades	5044001	61961424	155,4	-	-
M - 20 unidades	28176874	59615896	747,1	0,75	0,74
M - 20 unidades	27754884	59876056	729,7	0,73	-

Para hacer los cálculos se utiliza el valor R de la tabla N° 10

CALCULOS (CANTIDAD DE MUESTRA) TABLA N° 14

Cantidad de enzima = 10 unidades
Tiempo de digestión = 6 horas

MUESTRA	AREA TRP	AREA 5 - MT	mgTRP/100gM	g/100gM	PROMEDIO
Blk-10 unidades	2099161	50237528	133,6	-	-
30 mg	13521884	48948100	751,1	0,75	0,74
30 mg	13272443	49529796	724,5	0,72	-
Blk-10 unidades	2099161	50237528	80,1	-	-
40 mg	16742987	48531752	747,0	0,75	0,76
40 mg	17085944	48339256	767,3	0,77	-
Blk-10 unidades	2099161	50237528	80,1	-	-
50 mg	19927906	48381904	709,9	0,71	0,72
50 mg	19684068	47075880	721,9	0,72	-
Blk-10 unidades	2099161	50237528	66,8	-	-
60 mg	22957006	47071236	712,8	0,71	0,72
60 mg	23036200	46842488	719,3	0,72	-
Blk-10 unidades	2099161	50237528	57,2	-	-
70 mg	26643942	47523560	710,9	0,71	0,71
70 mg	26419732	47727716	701,2	0,70	-

Para hacer los cálculos se utiliza el valor R de la tabla N° 9

EVALUACION DE LA REPETIBILIDAD

Cantidad de muestra = 0,0500 g

Cantidad de enzima = 10 unidades

Tiempo de digestión = 6 horas

MUESTRA	AREA TRP	AREA 5 - MT	mgTRP/100gM	g/100gM
Bk-10 unidades	2099161	50237528	80,1	
M - 1	19849780	47178780	726,9	0,73
M - 2	19915338	46693948	738,0	0,74
M - 3	19902654	46957824	732,8	0,73
M - 4	20020424	47023948	736,5	0,74
M - 5	19815936	46597176	735,6	0,74
M - 6	20036046	47624152	726,8	0,73
M - 7	20087602	47233584	735,6	0,74

$$\bar{X} = 0,73 \text{ g/100gM}$$

$$S = 0,00$$

Para hacer los cálculos se utiliza el valor R de la tabla N° 9

EVALUACION DE LA EXACTITUD

Cantidad de enzima = 10 unidades
 Tiempo de digestión = 6 horas
 Cantidad de muestra = 0,0500 g

Muestra	Area TRP	Area 5 - MT	mgTRP/100gM	g/100gM	% recuperación
M - 1	16762784	42262100	707,8	0,71	-
M - 2	16900872	42037336	717,4	0,72	-
M - 1*	17826020	41766032	761,6	0,76	98,0
M - 2*	18020260	42182564	762,3	0,76	99,4

Cantidad añadida = 50 mg de Triptófano
 (Ver cálculo)

Para hacer los cálculos se utiliza el valor R de la tabla N° 11

CALCULO DEL LIMITE DE CUANTIFICACION

Cantidad de enzima = 10 unidades
 Tiempo de digestión = 6 horas

BLANCO (Bk)	AREA TRP	AREA 5 - MT	mgTRP/100gM	g/100gM
Bk-10 unidades	2099161	50237528	80,1	0,08
Bk-10 unidades	2117539	49624416	81,8	0,08
Bk-10 unidades	2087833	49581796	80,8	0,08
Bk-10 unidades	2070203	50006300	79,4	0,08
Bk-10 unidades	2120512	49096832	82,8	0,08

$$\bar{X} = 0,08$$

$$S = 0,00$$

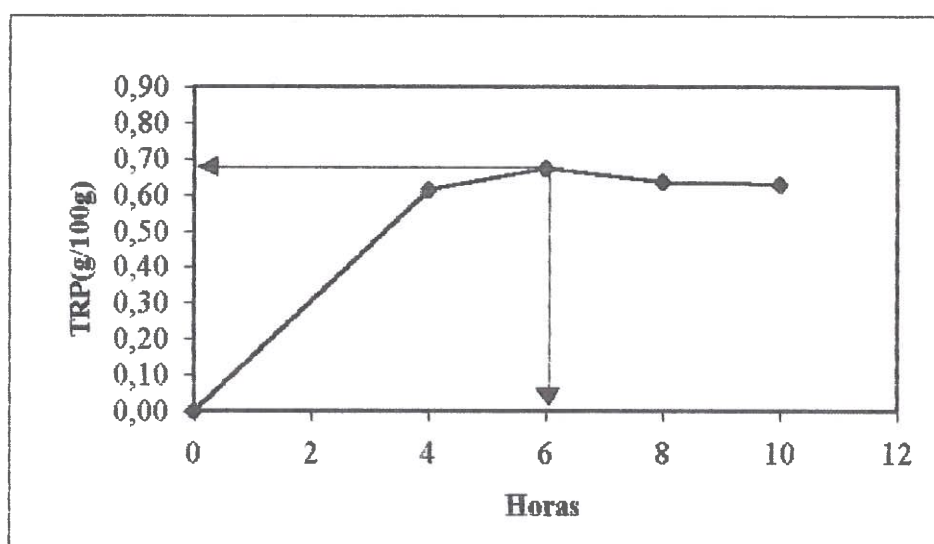
Límite de cuantificación = 0,08 g/100g M

Para hacer los cálculos se utiliza el valor R de la tabla N° 9

TABLA N ° 12 (TIEMPO DE DIGESTION)

Horas	TRP (g/100g)
0	0
4	0,61
6	0,67
8	0,64
10	0,63

Grafico I



Leyenda:

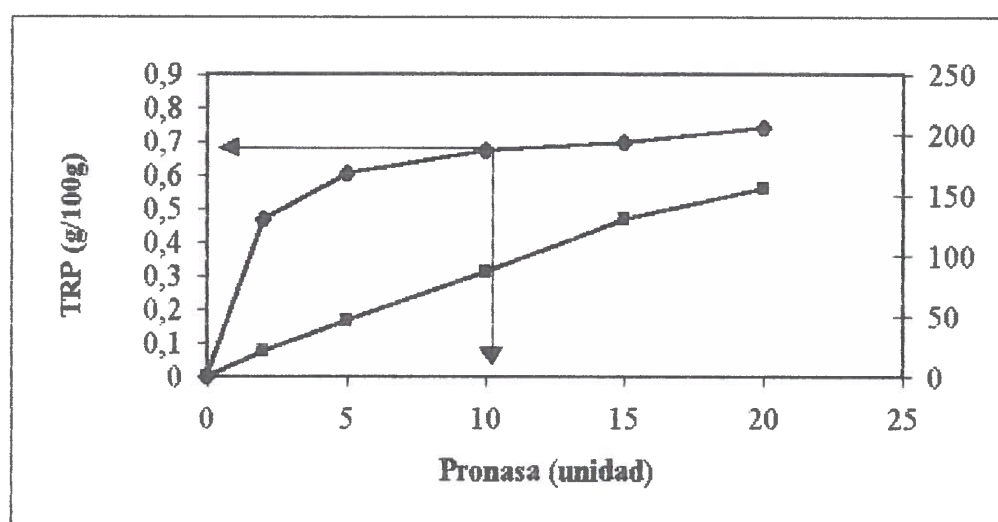
TRP (g/100g) = Concentración de Triptófano

horas = Tiempo de digestión

TABLA N ° 13 (CANTIDAD DE ENZIMA)

Pronasa (unidades)	TRP (g/100g)	mg Bk/100g
0	0	0
2	0,47	20,6
5	0,60	46,8
10	0,67	86,4
15	0,70	129,9
20	0,74	155,4

GRAFICO II



Leyenda :

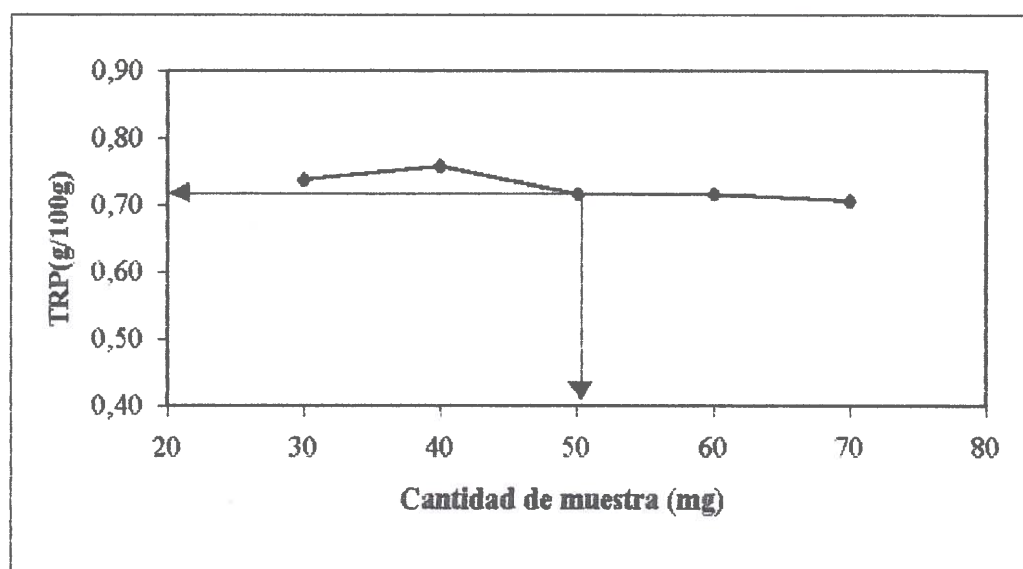
TRP (g/100g) = Concentración de Triptófano

Pronasa (unidad) = Unidades de enzima empleadas

TABLA N ° 14 (CANTIDAD DE MUESTRA)

Muestra (mg)	TRP (g/100g)
30	0,74
40	0,76
50	0,72
60	0,72
70	0,71

GRAFICO III



Leyenda :

TRP (g/100g) = Concentración de Triptófano

Muestra(mg) = Cantidad de muestra

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el gráfico I, vemos el incremento progresivo de la concentración de triptófano en la muestra hasta las 6 horas, después observamos que esta concentración se hace constante esto sucede porque la enzima ha hidrolizado toda la muestra y pasa a una forma inactiva.

En el gráfico II, puede observarse la relación que mantiene la concentración de triptófano y la concentración aparente del blanco, debemos decir que la concentración aparente del blanco se debe a la autólisis de la enzima, por lo tanto con el aumento de las unidades de enzima aumentará considerablemente el blanco, entonces de acuerdo al gráfico podemos ver que si es verdad que aumenta la concentración de triptófano en la muestra, la concentración aparente del blanco también aumenta, entonces de acuerdo al gráfico vemos que el punto más idóneo donde ni la concentración aparente del blanco es demasiado alta y la concentración de Triptófano se acerca al valor teórico del contenido de Triptófano en la harina de pescado (0,73% Según Boletín Técnico CERPER) ⁽¹⁾ es con 10 unidades de enzima.

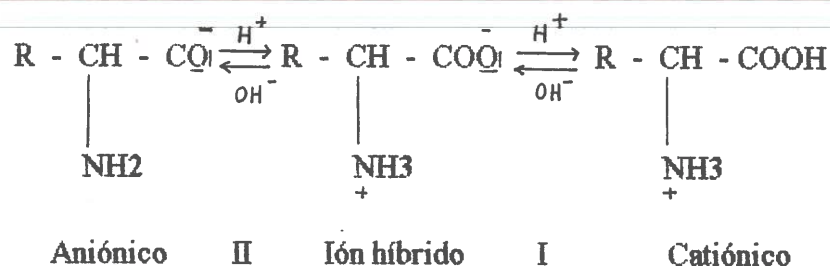
En el gráfico III, de acuerdo a la técnica que se tomo como base , la masa de muestra debe estar entre 10 y 100 mg, por esto hemos trabajado con un rango intermedio entre 30 y 70 mg de muestra, en la gráfica cantidad de muestra Vs. Concentración de triptófano vemos que a los valores bajos la concentración de triptófano es inestable, en cambio a valores intermedio como 50 y 60 mg los valores son constantes y nos indica que este son las masas idóneas para el análisis, en cambio a valores más altos la concentración comienza a descender esto se debe a que la muestra es demasiada para la concentración de enzima que esta tiene.

De acuerdo con los ensayos de repetibilidad con las mejores condiciones de digestión, apreciamos que la técnica tiene un alto grado de precisión, el cual se grafica en la desviación estándar igual 0.

De igual manera la exactitud aquí se evalúa con la adición del estándar Triptófano 100 mg/L a la muestra y obteniendo porcentajes de recuperación de 98,0 y 99,4% estando estos valores dentro de lo esperado.

Definitivamente el límite de cuantificación queda delimitado por la concentración aparente del blanco, que como ya se dijo es producto de la autólisis de la enzima, para obtener este límite se han hecho 7 ensayos que contienen 10 unidades de enzima que han sido digerido por 6 horas, el límite ha sido fijado en 0,1mg/100g Muestra.

En esta técnica un punto muy importante es el pH de la fase móvil, la molécula de triptófano presenta los siguientes equilibrios:



Debido a estos equilibrios es que el pH del buffer fosfato monobásico de sodio debe ser ajustado si es necesario con la ayuda de un potenciómetro, las proporciones de sal y de ácido son precisas para obtener este pH, pero aún así debe ser verificado y ajustado si es necesario, de lo contrario habría un descenso de la fluorescencia causado por que la molécula no se encuentra en la forma que fluoresce; pero sino es el caso el buffer debe ser regulado con la ayuda de un potenciómetro y ajustado con la adición de ácido clorhídrico 1 N, e inmediatamente después de su uso se debe dar un correcto lavado de la columna.

El cambio en la fase móvil de metanol a acetonitrilo, se debe principalmente a que siendo la harina de pescado una matriz con alto contenido de grasa, esta tiende a quedarse en la columna, por lo que es aconsejable un solvente de mayor polaridad que sea capaz de arrastrar los restos de grasa y así proteger la columna cromatografica de posibles daños.

VIII. CONCLUSIONES

1.- Para la determinación del contenido de Triptófano en la harina de pescado se han encontrado las siguientes condiciones óptimas para la digestión de la matriz:

- 6 horas en un baño maría con movimiento
- 50 mg de muestra
- 10 unidades de enzima

2.- El límite de cuantificación es 0,1 mg/100g Muestra

3.- El método es exacto y preciso, esto ha quedado demostrado por los porcentajes de recuperación y la repetibilidad respectivamente.

4.- Es necesario el ajuste del pH del buffer a 2,16 para tener tanto al triptófano como al 5-metil triptófano en la forma iónica correcta que produzca fluorescencia.

IX. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Garcia ; Baxter, "*Journal of AOAC International*" ; 1992, 75; No 6, 18
- 2.- Owen R. Fennema, "*Química de los alimentos*" , Segunda edición, Editorial Acribia S.A. - Zaragoza España, 1993, p. 359-377.
- 3.- Bourgeois C.M., "*Proteínas Animales, Extractos, Concentrados y Aislados de Alimentación Humana*" , Editorial El Manual Moderno, México D.F. , 1986, pág. 263.
- 4.- H.D. Belitz; W. Grosch, "*Química de los alimentos*" Segunda edición, Editorial Acribia, México, 1981, pág. 58.
- 5.- R. W. Yost ; L. S. Ettre; R. D. Conlon, "*Introducción de la Cromatografía Líquida Práctica*" ,Perkin Elmer - Estados Unidos, 1981, pág. 74 - 87, 122 - 137
- 6.- Raymond P.W. Scott, "*Techniques and Practice of Chromatography*" , Editorial Marcel Dekker, Inc.; Estados Unidos, 1995, pág.180.
- 7.- A. T. Rhys Williams, "*Detection in Liquid Chromatography*" , Perkin Elmer - Estados Unidos, 1980, pág. 38 - 46
- 8.- Douglas A. Skoog ; James J. Leary, "*Analysis Instrumental*" , Cuarta edición; Editorial Mc Graw-Hill, 1994, pág.678
- 9.- F. Albert Cotton; Geoffrey Wilkinson, "*Química Inorgánica Avanzada*" , Cuarta edición, Editorial Limusa, 1990, pág. 1587-1590.
- 10.- Gesser G. Hawley , "*Condensed Chemical Dictionary*", Doceava edición, Editorial Van Nostrand Reinhold Company, 1993, pág. 1191.
- 11.- CERPER , "*Boletín Técnico CERPER*", 1995, N° 001, 3

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

BOMBA	:Perkin Elmer Modelo 250
INTEGRADOR	:PE – Nelson Modelo 1020
HORNO	:SSI Modelo 505
DETECTOR	:Fluorómetro Modelo 240
COLUMNA	:Novapack C-8 Marca Waters (3,9mm x 150mm)
VOLUMEN DE INYECCION	:50 uL
FLUJO	:1 mL/min.
TEMPERATURA DEL HORNO	:50 °C
LONGITUD DE EMISION	:345 nm
LONGITUD DE EXCITACIÓN	:295 nm

File : T____23.D01
 Run : 01
 Path : C:\CHROM\T
 Collection : 17:17:22 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [15:55:03 Sep 23 1998]
 Integration: 17:17:22 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [15:55:03 Sep 23 1998]
 Report : 17:26:24 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [15:55:03 Sep 23 1998]

G.COSCO S.
 Type : Sample
 std. 2 ug/ml

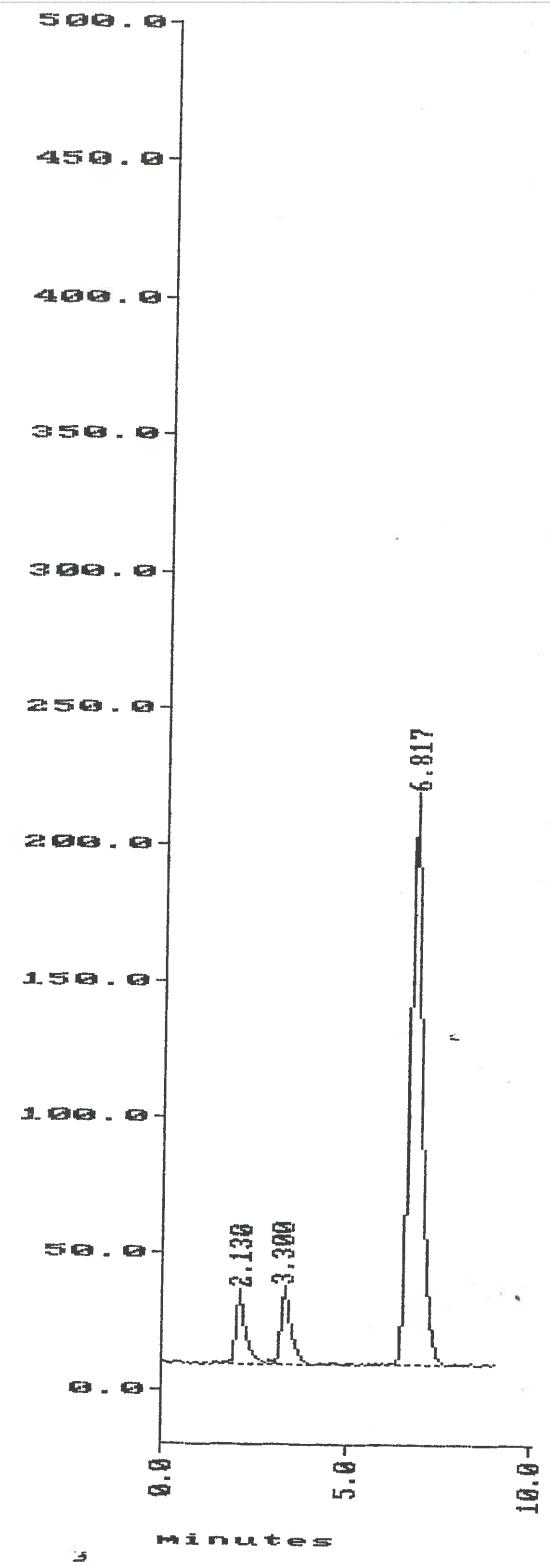
Curva: cantidad de muestra

PERCENT (AREA)

PK #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	2.130	4578959	27.4645	T	7.9255	10.3038
2	3.300	5460813	28.8065	T	9.4519	10.8073
3	6.816	47734948	210.2750	T	82.6226	78.8888

3 Peaks > Area Reject 57774720 Total Area
 3 Peaks > Height Reject 266.546 Total Height

(T____23.D01) mV



File : T_14.D01

Run : 02

Path : C:\CHROM\T

Collection : 15:28:52 Sep 23 1998

Integration: 15:43:51 Sep 23 1998

Report : 15:43:59 Sep 23 1998

STD. 6 ug/ml

G.COSCO S.
Type : Sample

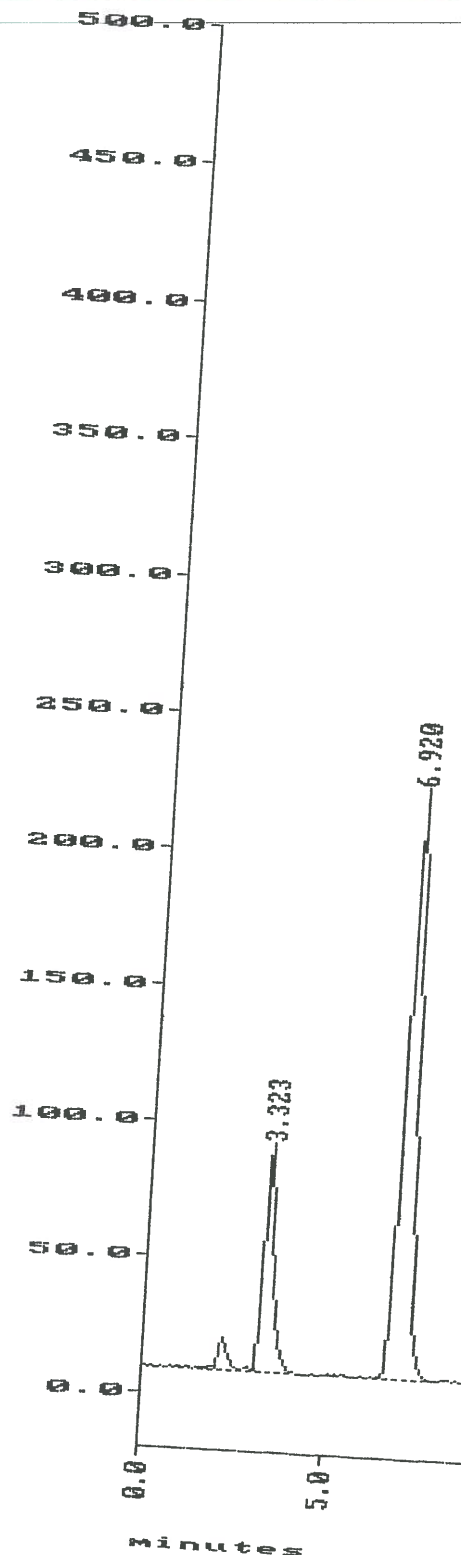
Method : TRIPTOFA [15:26:21 Sep 23 1998]
Method : TRIPTOFA [15:43:31 Sep 23 1998]
Method : TRIPTOFA [15:43:31 Sep 23 1998]

PERCENT (AREA)

Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	3.323	16032790	84.4260	T	24.5214	27.9730
2	6.920	49349956	217.3864		75.4786	72.0270

2 Peaks > Area Reject 65382744 Total Area
2 Peaks > Height Reject 301.812 Total Height

(T_14.D01) MW



File : T____15.D01
 Run : 01
 Path : C:\CHROM\T
 Collection : 15:44:36 Sep 23 1998
 Integration: 15:44:36 Sep 23 1998
 Report : 15:52:39 Sep 23 1998

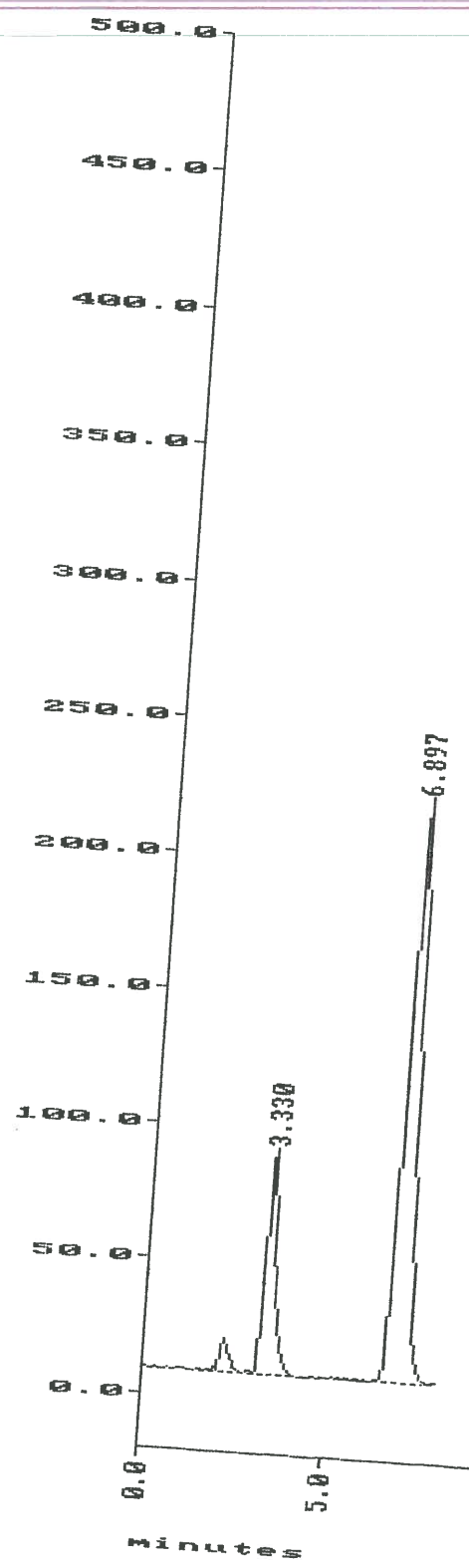
STD. 6 ug/ml

G.COSCO S
 Type : Sample

Method : TRIPTOFA [15:43:31 Sep 23 1998]
 Method : TRIPTOFA [15:43:31 Sep 23 1998]
 Method : TRIPTOFA [15:43:31 Sep 23 1998]

PERCENT (AREA)				
PK #	RT	Area	Height	BC
1	3.330	15685609	84.1592	T
2	6.896	49292648	216.0776	V
2 Peaks > Area Reject		64978256	Total Area	
2 Peaks > Height Reject		300.237	Total Height	
		24.1398	28.0309	
		75.8602	71.9691	

(T____15.D01) mV



End Time altered manual ' on Channel A.

File : T____16.D01
 Run : 01
 Path : C:\CHROM\T
 Collection : 15:54:49 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [15:54:18 Sep 23 1998]
 Integration: 15:54:49 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [15:54:18 Sep 23 1998]
 Report : 16:03:53 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [15:55:03 Sep 23 1998]

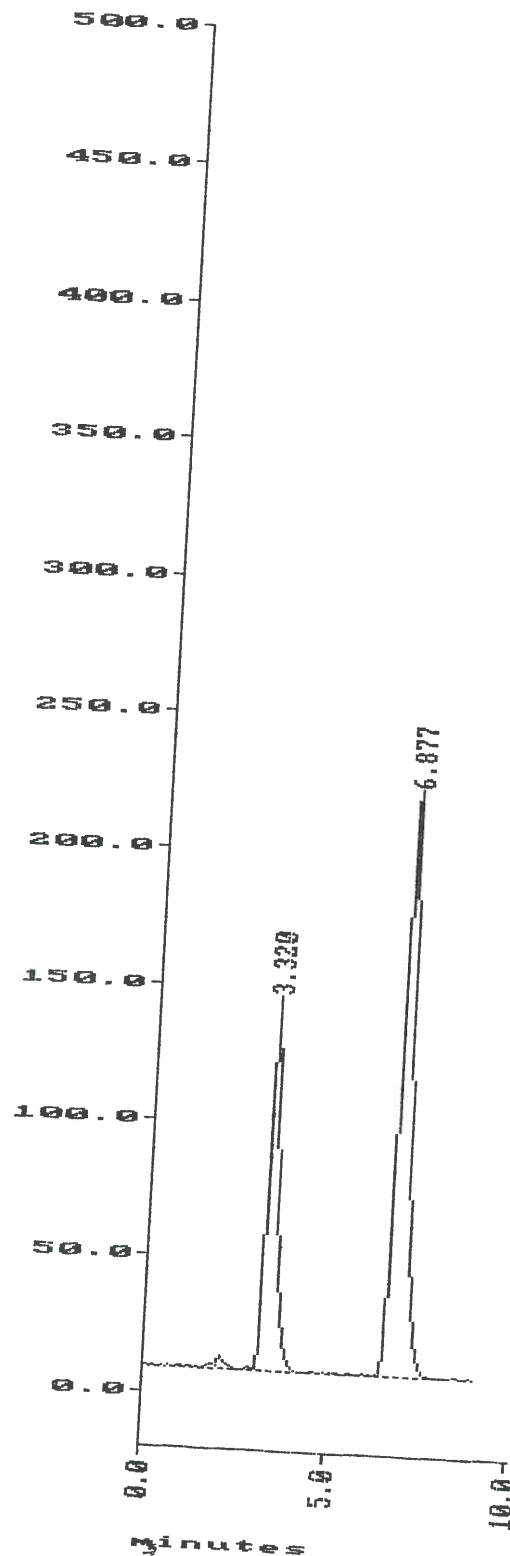
G.COSCO S.
 Type : Sample

std 10 ug/ml

PERCENT (AREA)

PK #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	3.320	26013242	137.7254	T	34.3767	38.9660
2	6.877	49657908	215.7247	T	65.6233	61.0340
2 Peaks > Area Reject 75671152 Total Area						
2 Peaks > Height Reject 353.450 Total Height						

(T____16.D01) mV



File : T_17.D01

Run : 02

Path : C:\CHROM\T

Collection : 16:04:34 Sep 23 1998

Integration: 16:04:34 Sep 23 1998

Report : 16:13:38 Sep 23 1998

std 10 ug/ml

G.COSCO S.
Type : Sample

Method : TRIPTOFA [15:55:03 Sep 23 1998]
Method : TRIPTOFA [15:55:03 Sep 23 1998]
Method : TRIPTOFA [15:55:03 Sep 23 1998]

PERCENT (AREA)

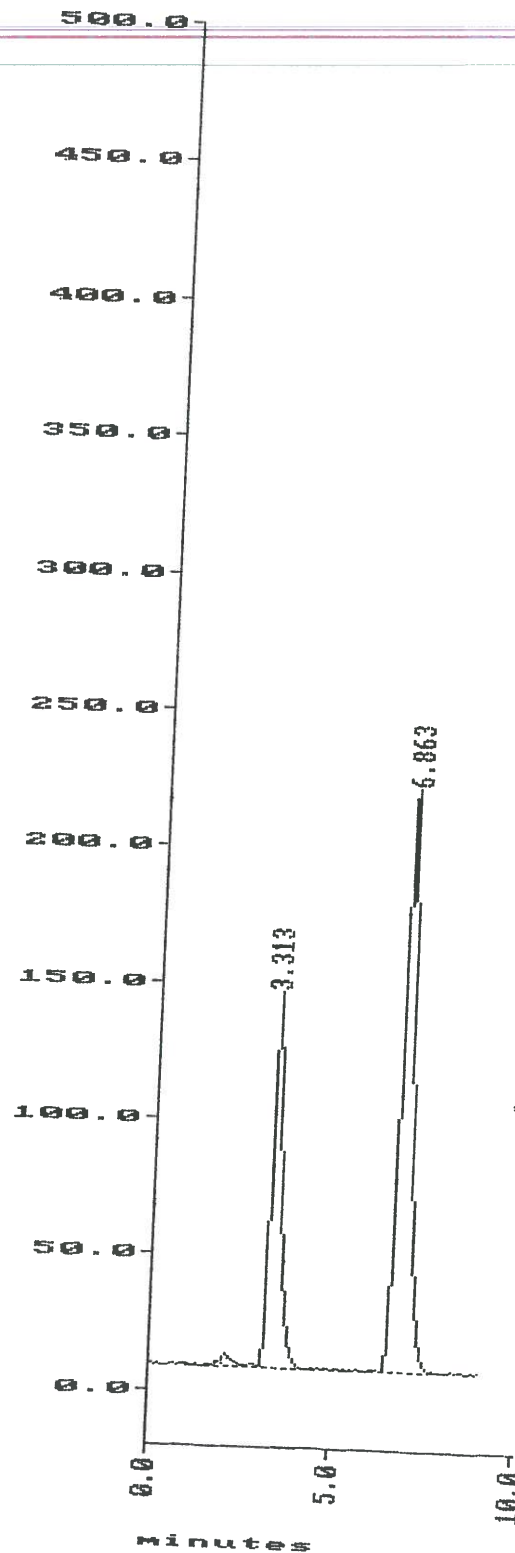
PK #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	3.313	26250094	138.4767	T	34.7544	39.2644
2	6.863	49280204	214.2004	V	65.2456	60.7356

2 Peaks > Area Reject

2 Peaks > Height Reject

75530296 Total Area
352.677 Total Height

(T_17.D01) mV



File : T_18.D01
Run : 01
Path : C:\CHROM\T
Collection : 16:14:49 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [15:55:03 Sep 23 1998]
Integration: 16:14:49 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [15:55:03 Sep 23 1998]
Report : 16:23:54 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [15:55:03 Sep 23 1998]

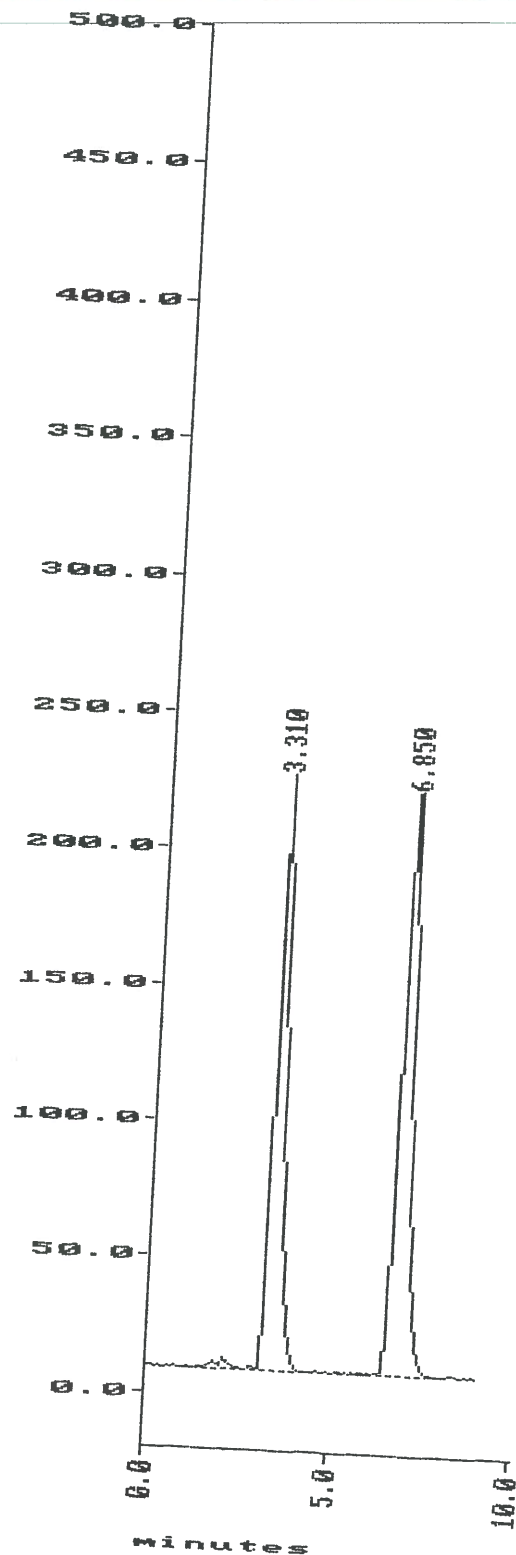
std. 16 ug/ml

G.COSCO S.
Type : Sample

PERCENT (AREA)

PK #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	3.310	41945804	218.9689	T	45.9504	50.5157
2	6.850	49339176	214.4979	V	54.0496	49.4843
2 Peaks > Area Reject		91284976	Total Area			
2 Peaks > Height Reject		433.467	Total Height			

(T_18.D01) MV



File : T____19.D01
 Run : 02
 Path : C:\CHROM\T
 Collection : 16:29:15 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [15:55:03 Sep 23 1998]
 Integration: 16:29:15 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [15:55:03 Sep 23 1998]
 Report : 16:38:19 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [15:55:03 Sep 23 1998]

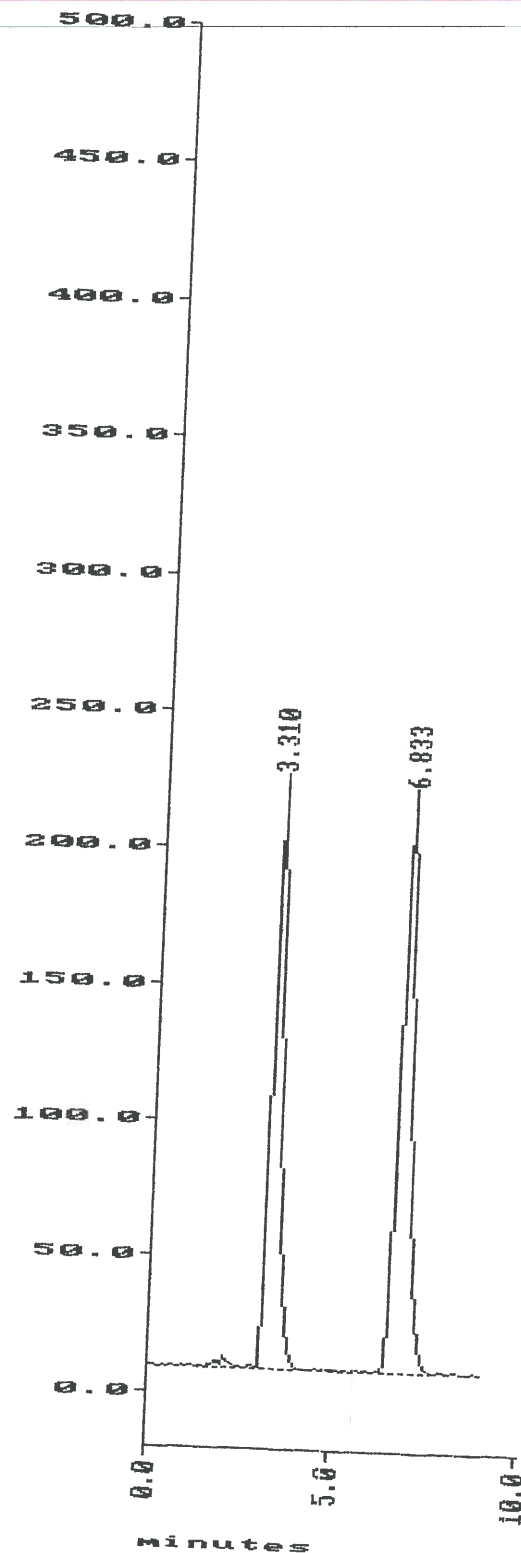
std. 16 ug/ml

G.COSCO S.
 Type : Sample

PERCENT (AREA)

PK #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	3.310	41784812	218.9068	T	45.9217	50.5112
2	6.833	49206640	214.4757	V	54.0783	49.4888
2 Peaks > Area Reject		90991456	Total Area			
2 Peaks > Height Reject		433.382	Total Height			

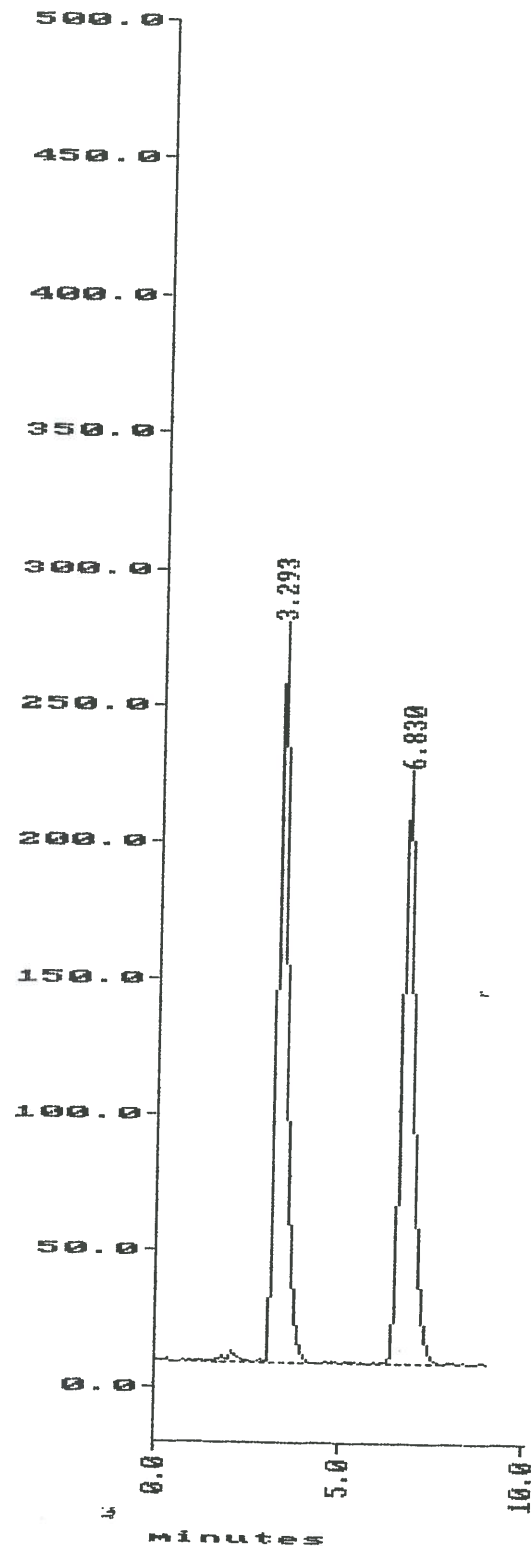
(T____19.D01) mV



G.COSCO S.
Type : Sample

```
2 Peaks > Area Reject 102370208 Total Area
2 Peaks > Height Reject 490.117 Total Height
```

(T_20.D01) WU



G. COSCO S.
Type : Samples

Std 20 ug/ml

File: T_____21.D01

Run :: 02

Path : C:\CHROM\T

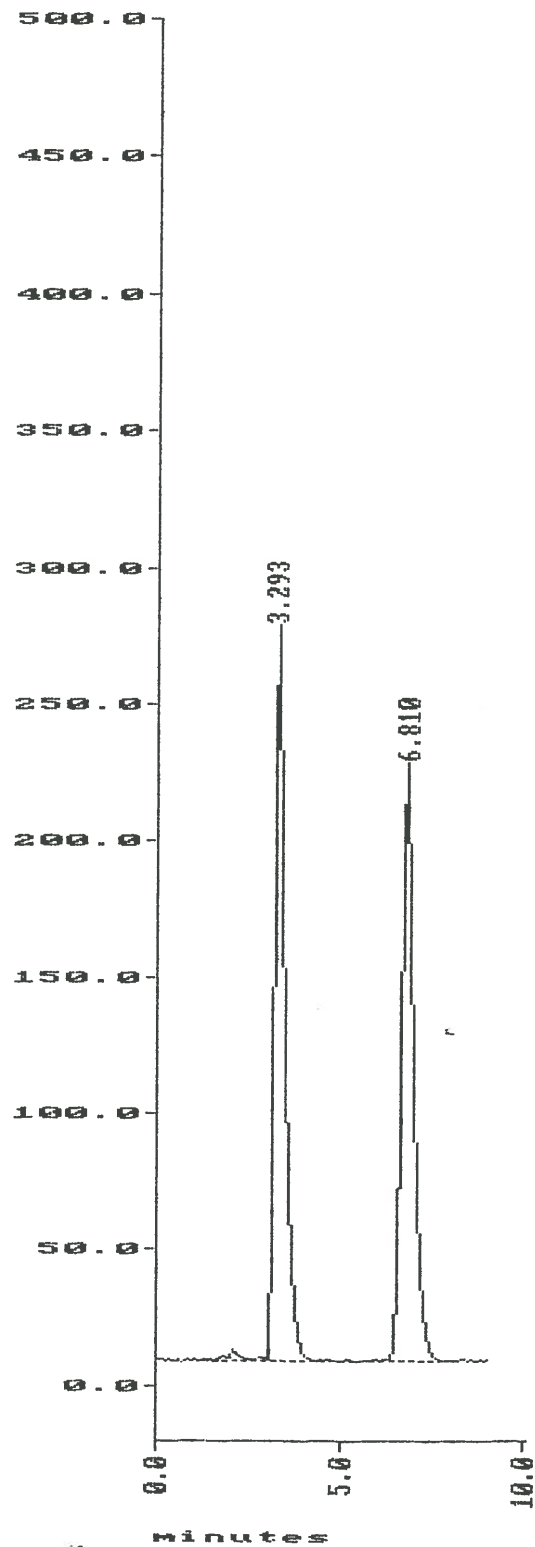
Collection :	16:56:37	Sep 23 1998	Method :	TRIPTOFA	[15:55:03	Sep 23 1998]
Integration:	16:56:37	Sep 23 1998	Method :	TRIPTOFA	[15:55:03	Sep 23 1998]
Report	: 17:05:42	Sep 23 1998	Method :	TRIPTOFA	[15:55:03	Sep 23 1998]

PERCENT (AREA)

PK #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	3.293	51934352	270.0098	T	50.8297	55.1418
2	6.810	50238904	219.6547		49.1703	44.8582

2 Peaks	> Area Reject	Total Area
2 Peaks	> Height Reject	Total Height

(T_21.D01) HU



File : T____22.D01
 Run : 03
 Path : C:\CHROM\T
 Collection : 17:07:18 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [15:55:03 Sep 23 1998]
 Integration: 17:07:18 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [15:55:03 Sep 23 1998]
 Report : 17:16:22 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [15:55:03 Sep 23 1998]

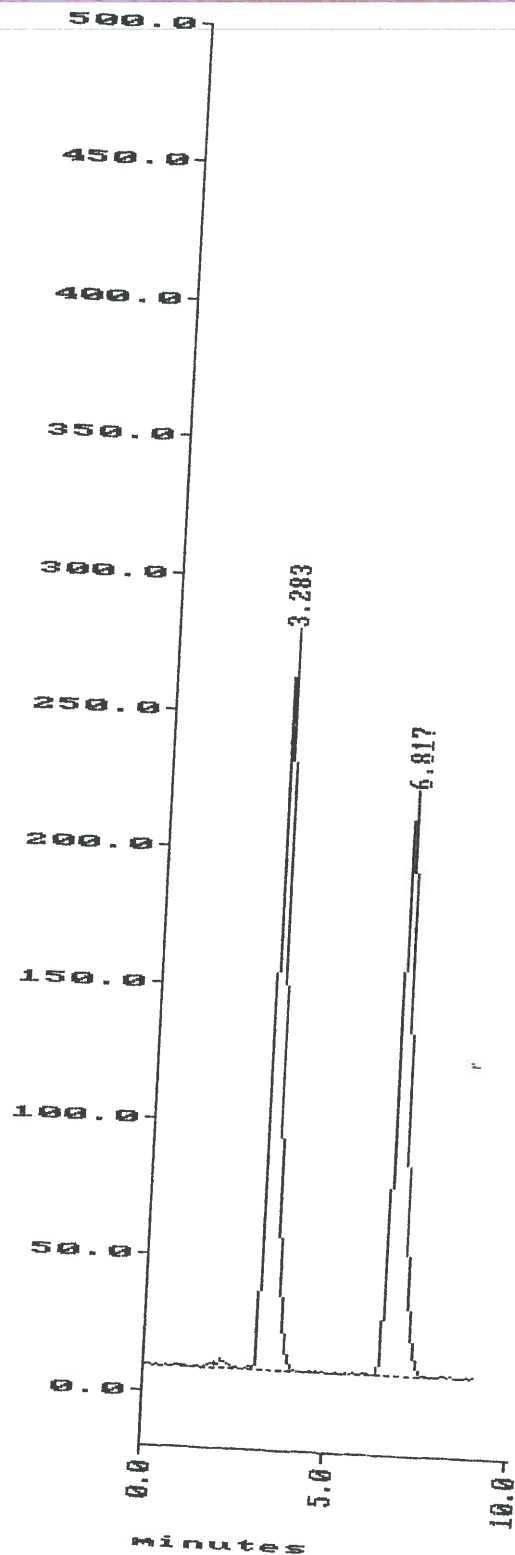
G.COSCO S.
 Type : Sample

std 20 ug/ml

PERCENT (AREA)

PK #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	3.283	52153448	272.2051	T	51.1688	55.8729
2	6.816	49770872	214.9811		48.8312	44.1271
2 Peaks > Area Reject		101924320	Total Area			
2 Peaks > Height Reject		487.186	Total Height			

(T____22.D01) mV



File : T____25.D01
Run : 01
Path : C:\CHROM\T
Collection : 17:38:20 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [15:55:03 Sep 23 1998]
Integration: 14:58:24 Sep 26 1998 Method : TRIPTOFA [14:57:48 Sep 26 1998]
Report : 14:58:32 Sep 26 1998 Method : TRIPTOFA [14:57:48 Sep 26 1998]

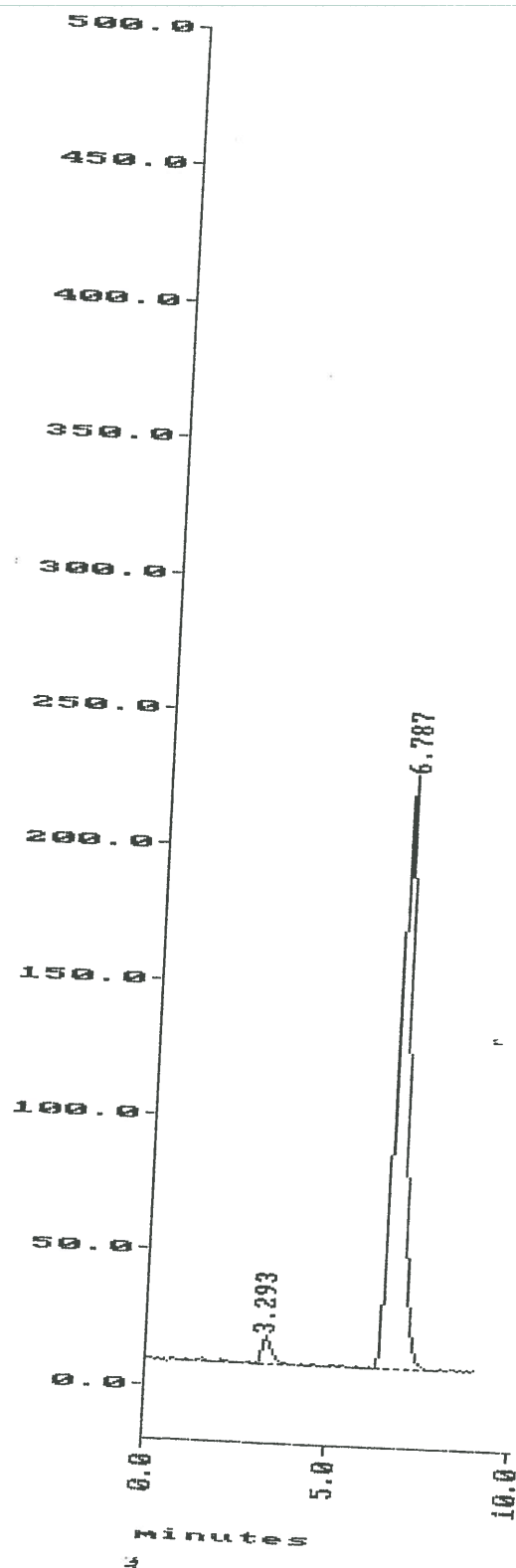
BLANCO

G.COSCO S.
Type : Sample

PERCENT (AREA)

PK #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	3.293	2099161	10.6421	T	4.0109	4.6228
2	6.787	50237528	219.5648	V	95.9891	95.3772
2 Peaks > Area Reject 52336688 Total Area						
2 Peaks > Height Reject 230.207 Total Height						

(T____25.D01) mV



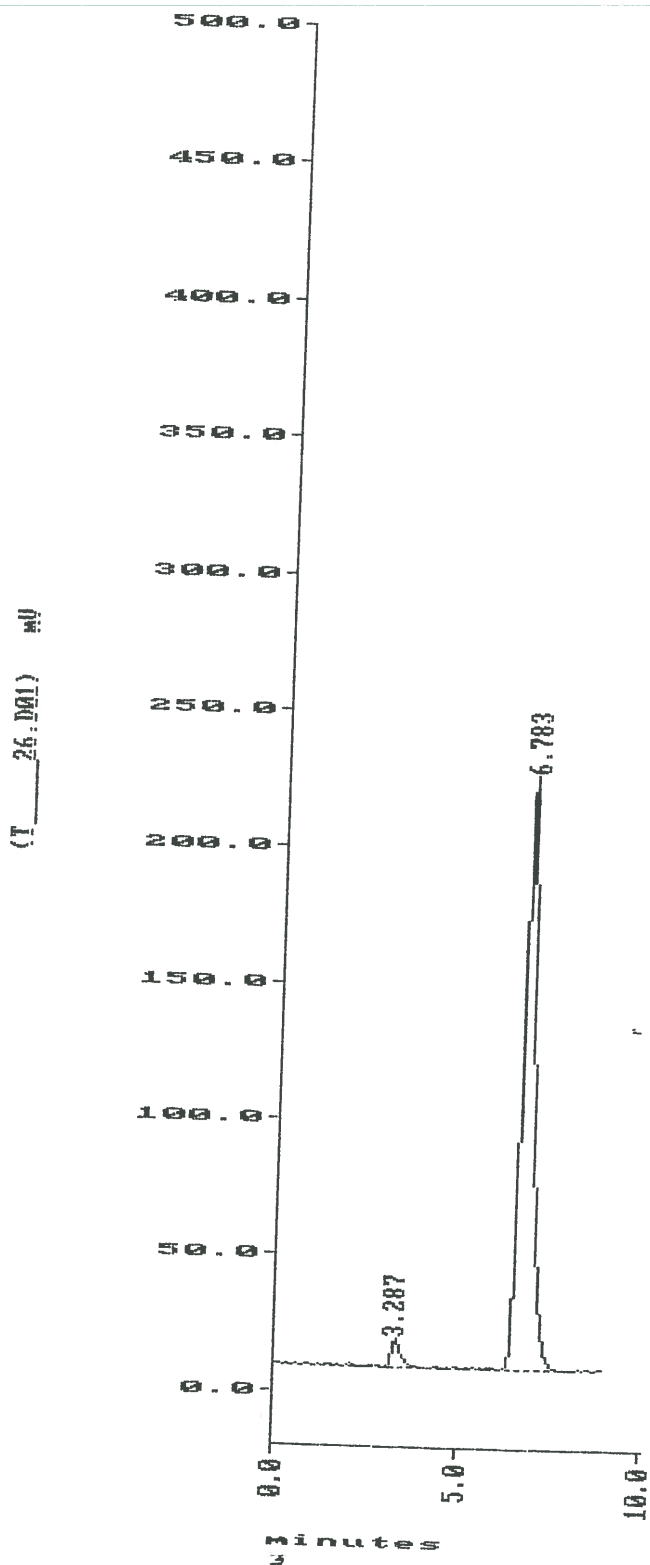
File : T_____26.D01
Run : 01
Path : C:\CHROM\T
Collection : 17:48:07 Sep 23 1998
Integration: 14:59:17 Sep 26 1998
Report : 14:59:25 Sep 26 1998

Method : TRIPTOFA [15:55:03 Sep 23 1998]
Method : TRIPTOFA [14:57:48 Sep 26 1998]
Method : TRIPTOFA [14:57:48 Sep 26 1998]

BLANCO/2

G.COSCO S.
Type : Sample

PERCENT (AREA)					
Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent
1	3.287	2117539	10.5667	T	4.0925
2	6.783	49624416	218.7444	V	95.9075
2 Peaks > Area Reject 51741956 Total Area					
2 Peaks > Height Reject 229.311 Total Height					
4.6080					
95.3920					



File : T_27.D01
Run : 01
Path : C:\CHROM\T
Collection : 17:57:36 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [17:57:03 Sep 23 1998]
Integration: 14:59:37 Sep 26 1998 Method : TRIPTOFA [14:57:48 Sep 26 1998]
Report : 14:59:49 Sep 26 1998 Method : TRIPTOFA [14:57:48 Sep 26 1998]

BLANCO/3

G.COSCO S.
Type : Sample

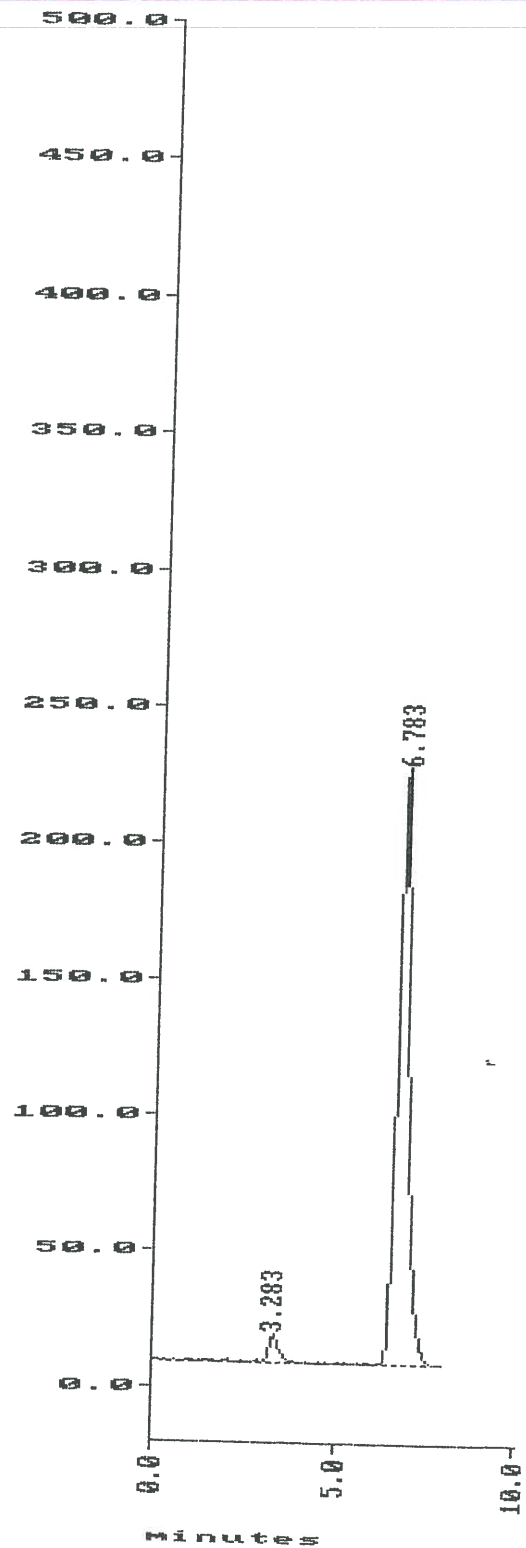
PERCENT (AREA)

PK #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	3.283	2087833	10.6340	T	4.0407	4.6154
2	6.783	49581796	219.7674	V	95.9593	95.3846

2 Peaks > Area Reject
2 Peaks > Height Reject

51669628 Total Area
230.401 Total Height

(T_27.D01) mV

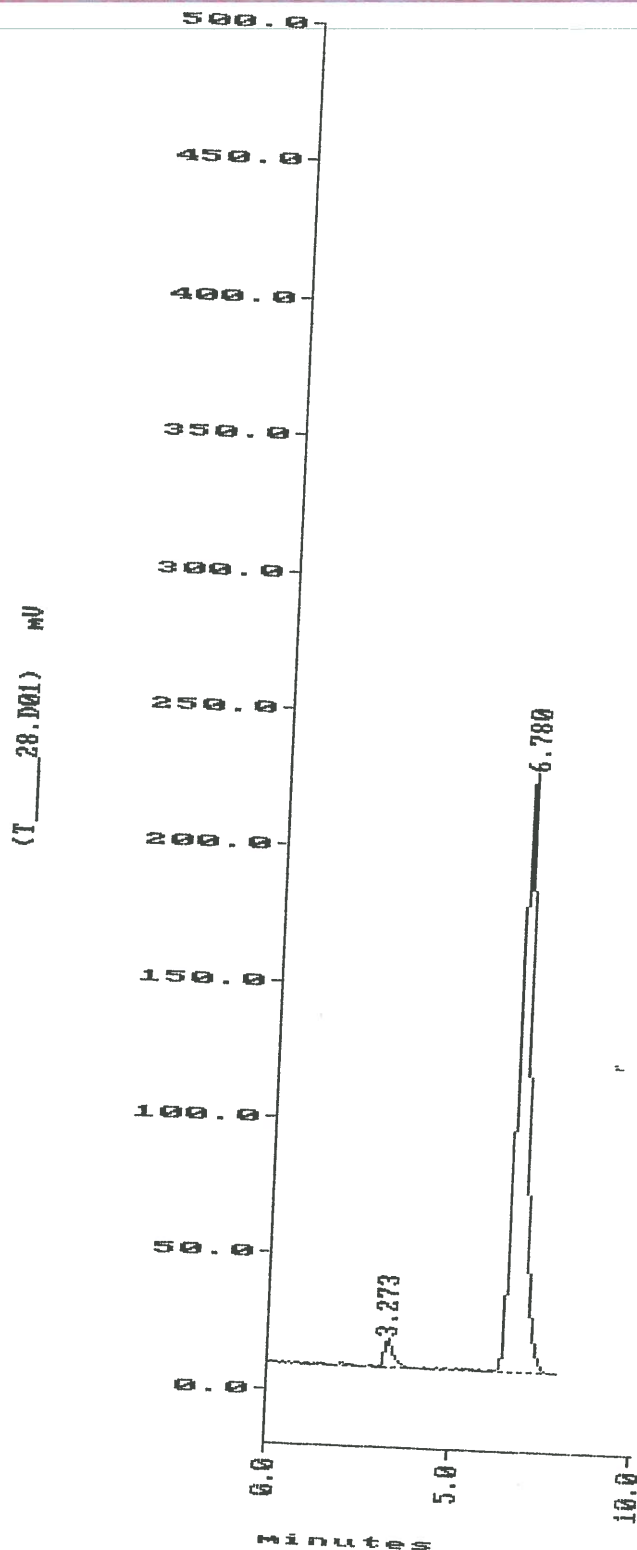


File : T____28.D01
Run : 01
Path : C:\CHROM\T
Collection : 18:06:27 Sep 23 1998
Integration: 15:00:00 Sep 26 1998
Report : 15:00:12 Sep 26 1998

Method : TRIPTOFA [17:57:03 Sep 23 1998]
Method : TRIPTOFA [14:57:48 Sep 26 1998]
Method : TRIPTOFA [14:57:48 Sep 26 1998]

BLANCO/4
G.COSCO S.
Type : Sample

PERCENT (AREA)					
Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent
1	3.273	2070203	10.7034	T	3.9753
2	6.780	50006300	220.0247		96.0247
2 Peaks > Area Reject					
2 Peaks > Height Reject					
52076504 Total Area					
230.728 Total Height					
4.6390					
95.3610					



File : T____29.D01
Run : 01
Path : C:\CHROM\T
Collection : 18:14:54 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [17:57:03 Sep 23 1998]
Integration: 15:00:22 Sep 26 1998 Method : TRIPTOFA [14:57:48 Sep 26 1998]
Report : 15:00:34 Sep 26 1998 Method : TRIPTOFA [14:57:48 Sep 26 1998]

BLANCO/5

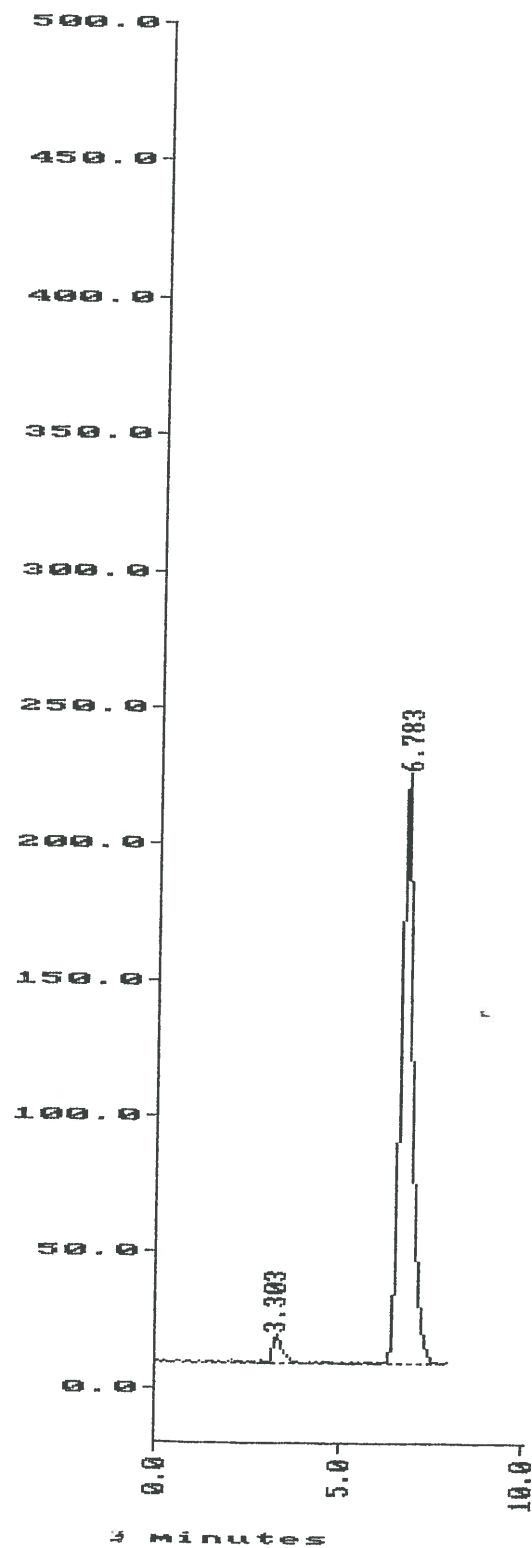
G.COSCO S.
Type : Sample

PERCENT (AREA)

PK #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	3.303	2120512	10.7025	T	4.1402	4.6916
2	6.783	49096832	217.4177	T	95.8598	95.3084

2 Peaks > Area Reject 51217344 Total Area
2 Peaks > Height Reject 228.120 Total Height

(T____29.D01) mV



***** MODEL 1020 RUNLOG for run: T____40 *****

End Time altered manually on Channel A.

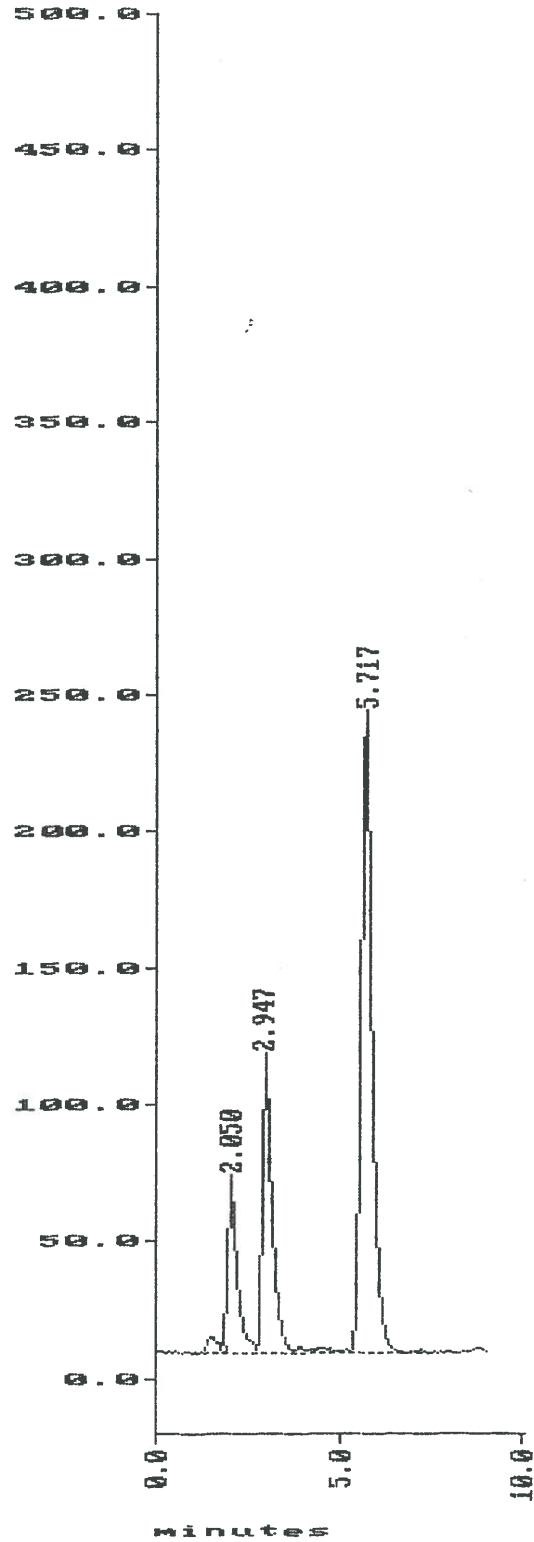
File : T____40.D01 G.COSCO S.
Run : 01 Type : Sample
Path : C:\CHROM\T
Collection : 20:04:44 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [19:59:59 Sep 23 1998]
Integration: 20:04:44 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [19:59:59 Sep 23 1998]
Report : 20:13:48 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]

PERCENT (AREA)

Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	2.050	11099672	64.8257	T	14.2560	15.8388
2	2.947	19684068	109.6325	T	25.2815	26.7864
3	5.717	47075880	234.8261	T	60.4625	57.3748

3 Peaks > Area Reject 77859616 Total Area
3 Peaks > Height Reject 409.284 Total Height

(T____40.D01) mV



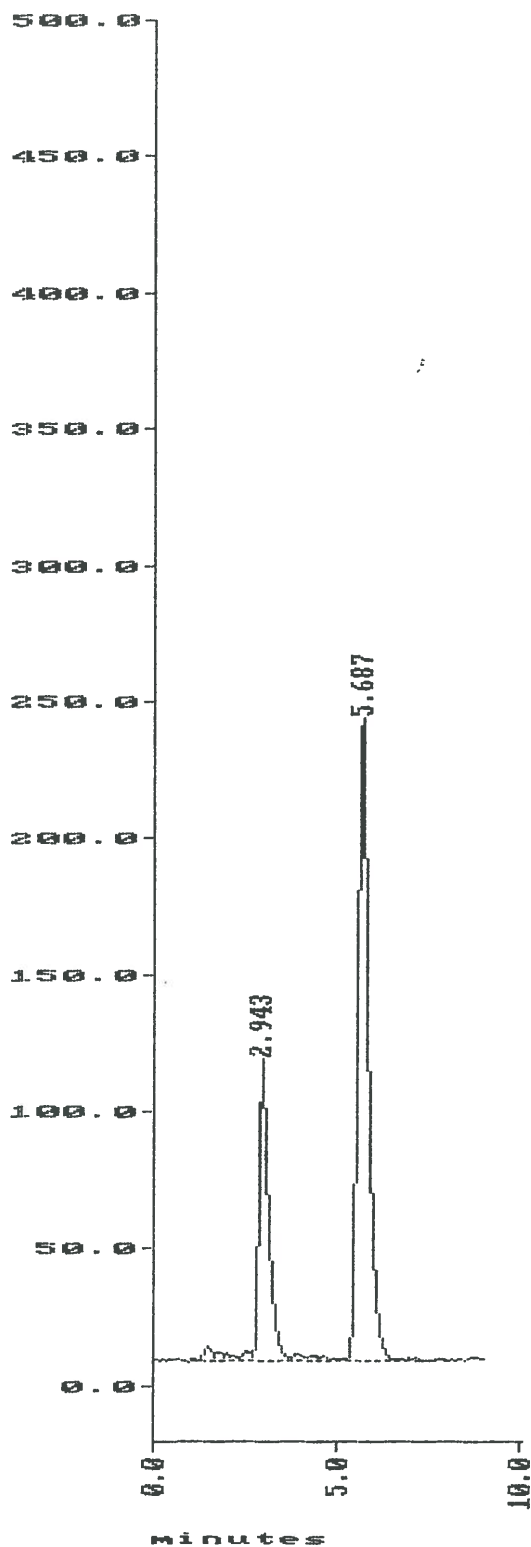
File : T_42.D01 M - 2 (50mg) G.COSCO S.
Run : 01 Type : Sample
Path : C:\CHROM\T
Collection : 20:39:37 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]
Integration : 20:39:37 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]
Report : 20:48:41 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]

PERCENT (AREA)

PK #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	2.943	19915338	110.3307	T	29.8987	31.9561
2	5.686	46693948	234.9262	T	70.1013	68.0439

2 Peaks > Area Reject 66609288 Total Area
2 Peaks > Height Reject 345.257 Total Height

(T_42.D01) MU



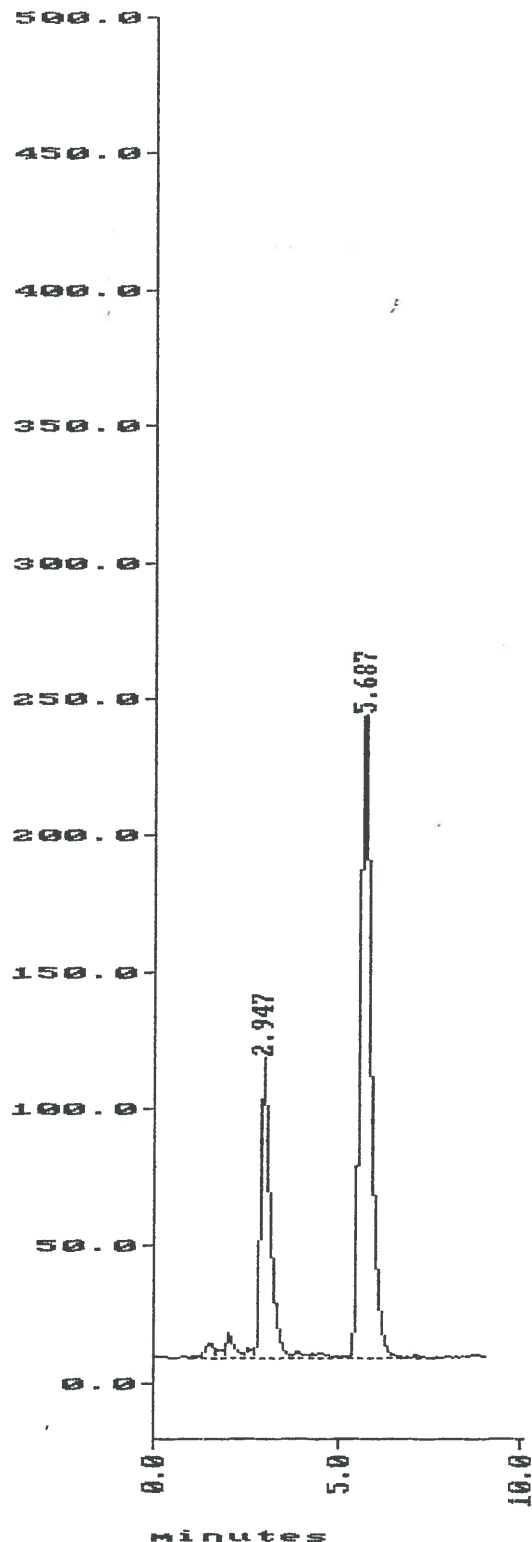
File : T____43.D01 M - 3 (50mg) G.COSCO S.
 Run : 01 Type : Sample
 Path : C:\CHROM\T
 Collection : 20:49:21 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]
 Integration: 20:49:21 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]
 Report : 20:58:25 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]

PERCENT (AREA)

Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	2.947	19902654	109.5563	T	29.7674	31.8233
2	5.686	46957824	234.7079	T	70.2326	68.1767

2 Peaks > Area Reject 66860480 Total Area
 2 Peaks > Height Reject 344.264 Total Height

(T____43.D01) mV



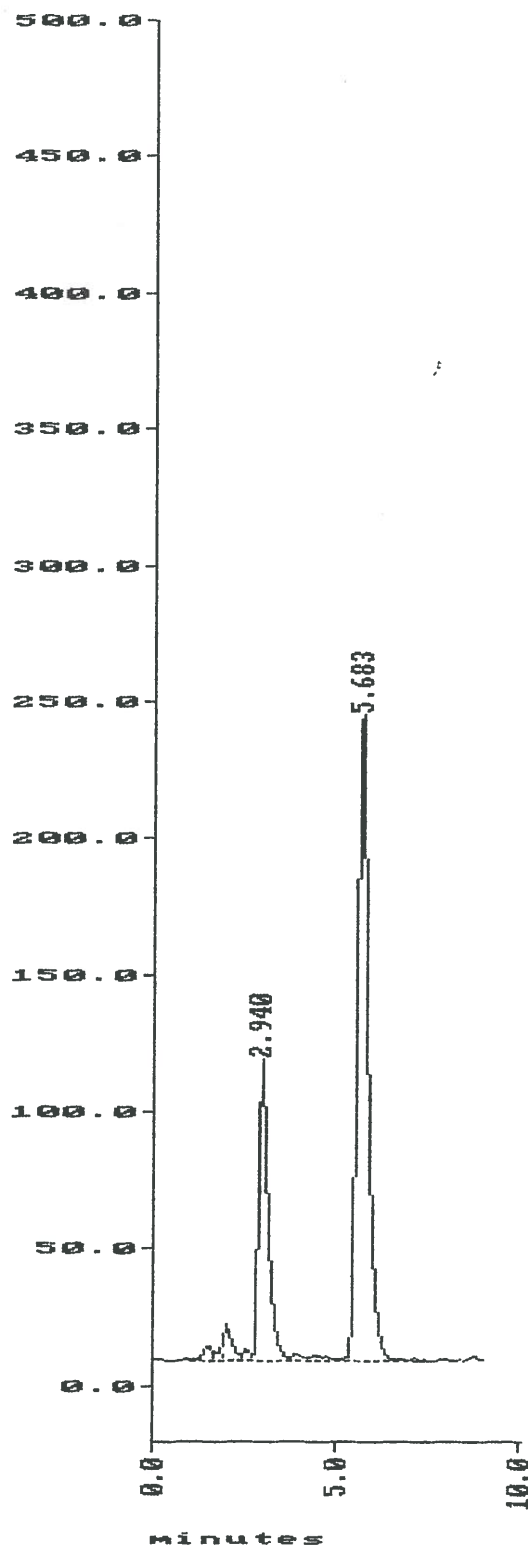
File : T____44.D01 M - 4 (50 mg) G.COSCO S.
 Run : 01 Type : Sample
 Path : C:\CHROM\T
 Collection : 20:59:07 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]
 Integration: 20:59:07 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]
 Report : 21:08:12 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]

PERCENT (AREA)

PK #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	2.940	20020424	110.3010	T	29.8615	31.8586
2	5.683	47023948	235.9199	T	70.1385	68.1414

2 Peaks > Area Reject 67044372 Total Area
 2 Peaks > Height Reject 346.221 Total Height

(T____44.D01) mV



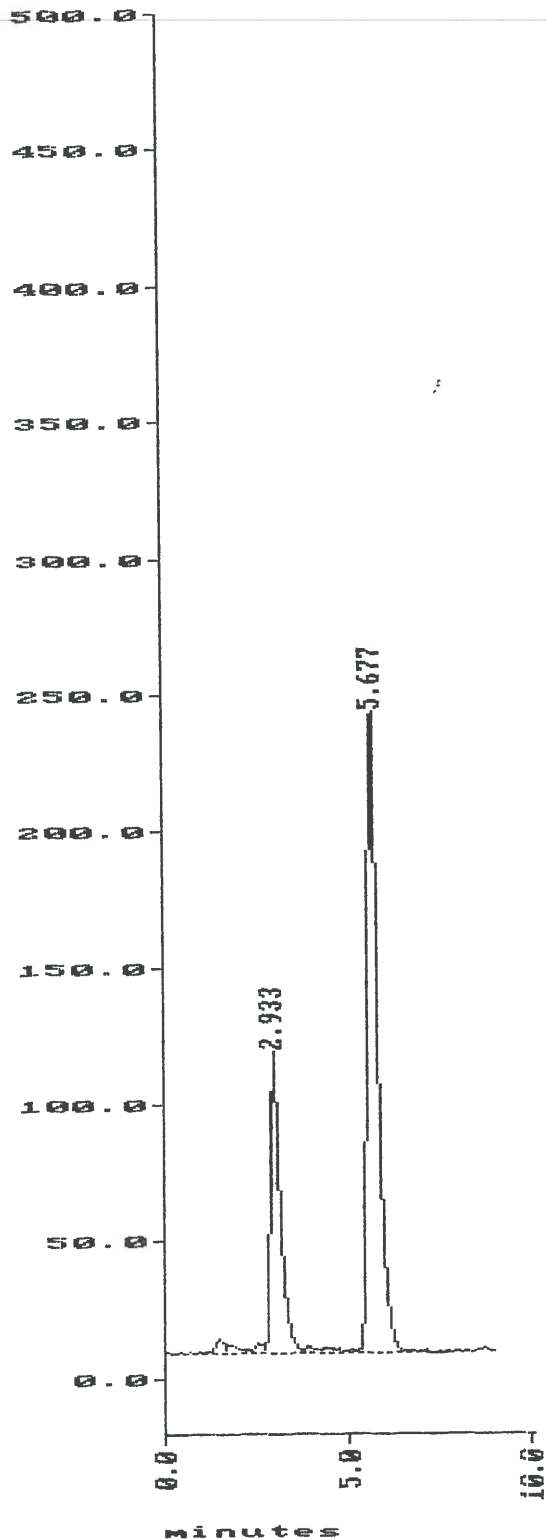
File : T____45.D01 M - 4 (50 mg) G.COSCO S.
 Run : 02 Type : Sample
 Path : C:\CHROM\T
 Collection : 21:10:00 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]
 Integration: 21:10:00 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]
 Report : 21:19:05 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]

PERCENT (AREA)

PK #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	2.933	19966496	109.9448	T	30.0776	31.9616
2	5.677	46416696	234.0449	T	69.9224	68.0383

2 Peaks > Area Reject 66383192 Total Area
 2 Peaks > Height Reject 343.990 Total Height

(T____45.D01) mV



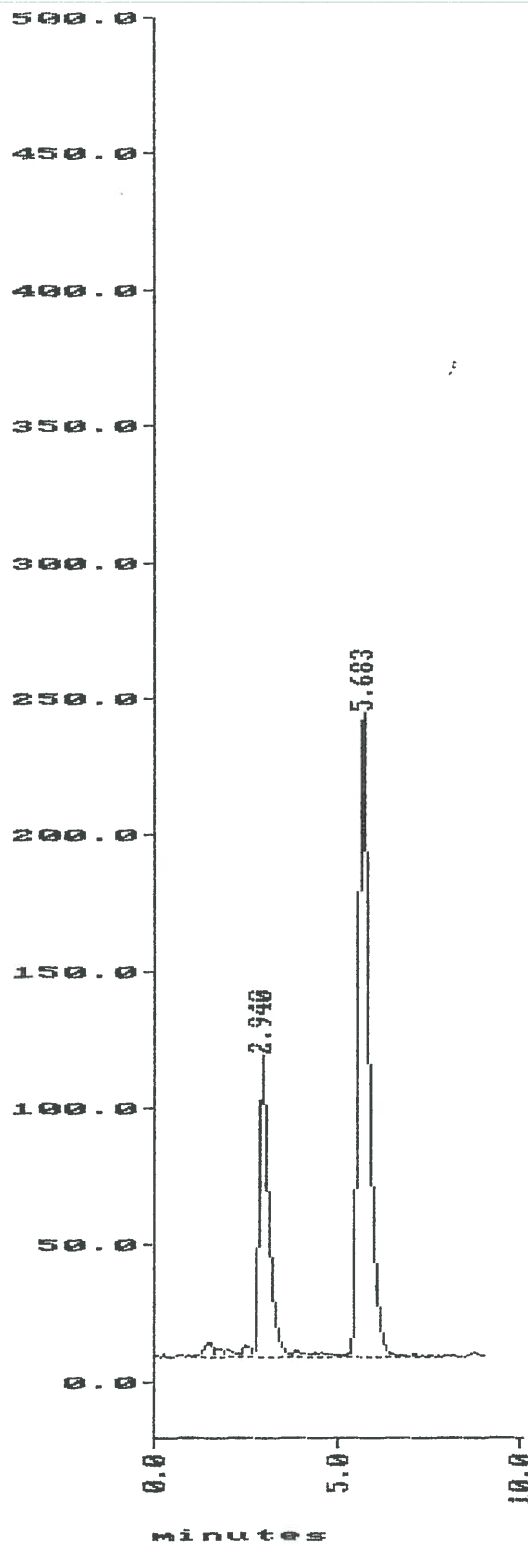
File : T____46.D01 M - 5 (50mg) G.COSCO S.
 Run : 01 Type : Sample
 Path : C:\CHROM\T
 Collection : 21:20:06 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]
 Integration: 21:20:06 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]
 Report : 21:29:09 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]

PERCENT (AREA)

Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	2.940	19815936	110.1769	T	29.8374	31.8944
2	5.683	46597176	235.2658	T	70.1626	68.1056

2 Peaks > Area Reject 66413112 Total Area
 2 Peaks > Height Reject 345.443 Total Height

(T____46.D01) mV



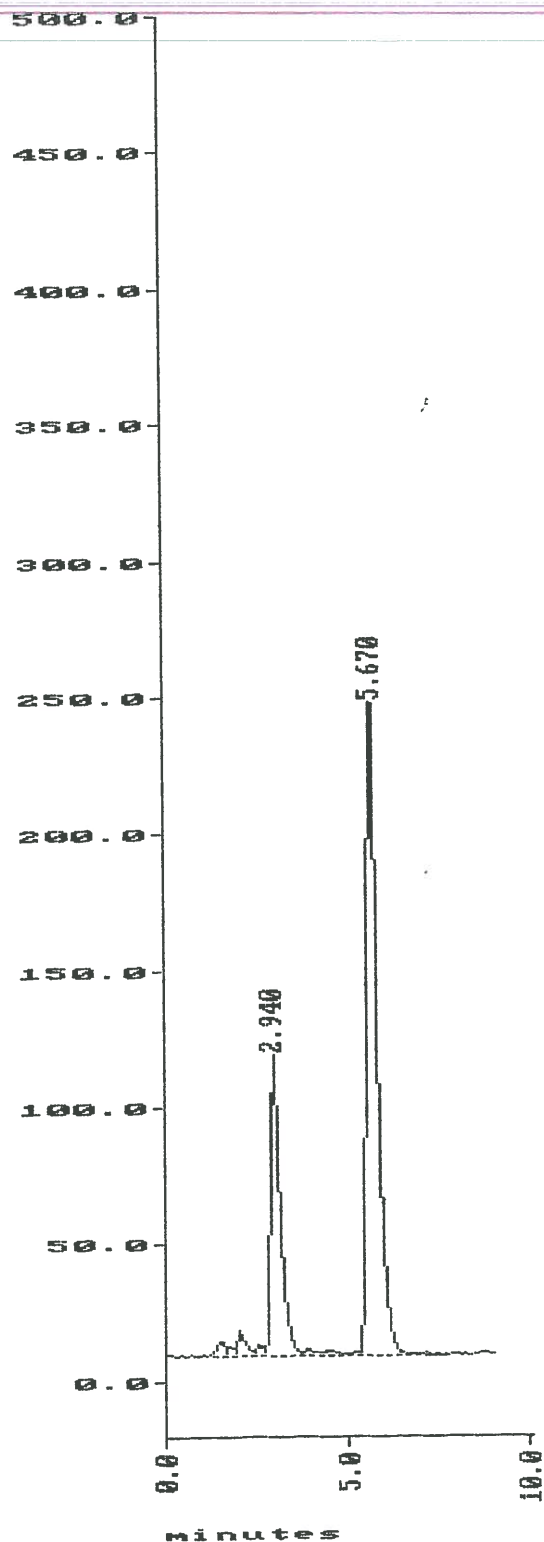
File : T____47.D01 M - 6 (50mg) G.COSCO S.
 Run : 01 Type : Sample
 Path : C:\CHROM\T
 Collection : 21:35:52 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]
 Integration: 21:35:52 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]
 Report : 21:44:56 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]

PERCENT (AREA)

Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	2.940	20036046	110.4028	T	29.6128	31.5950
2	5.670	47624152	239.0281	T	70.3872	68.4050

2 Peaks > Area Reject 67660200 Total Area
 2 Peaks > Height Reject 349.431 Total Height

(T____47.D01) mV



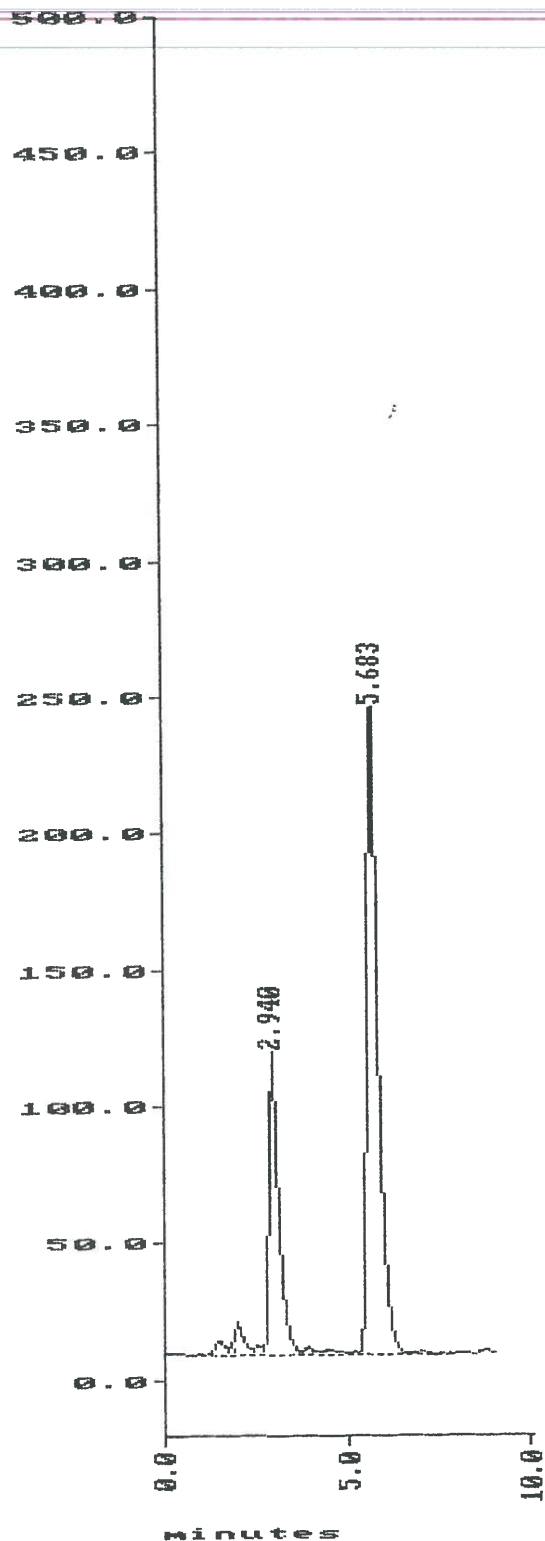
File : T____48.D01 M - 7 (50mg) G.COSCO S.
 Run : 01 Type : Sample
 Path : C:\CHROM\T
 Collection : 21:45:27 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]
 Integration: 21:45:27 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]
 Report : 21:54:31 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [20:04:58 Sep 23 1998]

PERCENT (AREA)

PK #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	2.940	20087602	110.7263	T	29.8385	31.8920
2	5.683	47233584	236.4654	T	70.1615	68.1080

2 Peaks > Area Reject 67321184 Total Area
 2 Peaks > Height Reject 347.192 Total Height

(T____48.D01) MV



File : T____38.D01
Run : 01
Path : C:\CHROM\T
Collection : 19:41:11 Sep 23 1998
Integration: 19:41:11 Sep 23 1998
Report : 19:50:15 Sep 23 1998

M - 70 mg

G.COSCO S.
Type : Sample

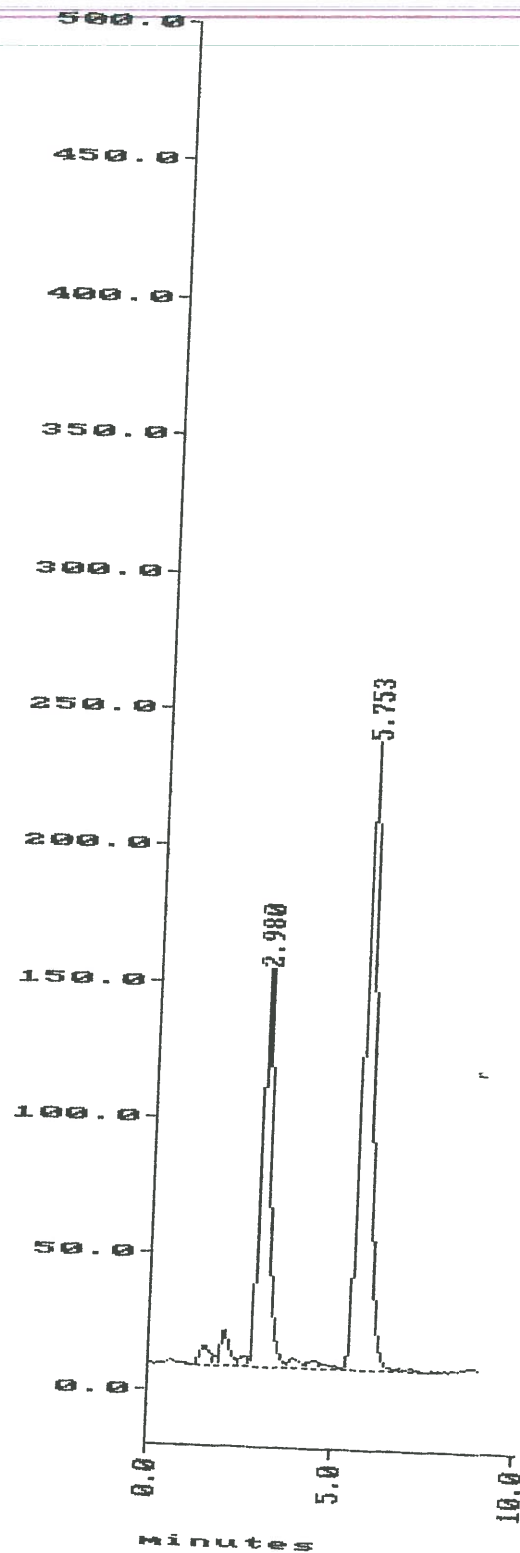
Method : TRIPTOFA [19:15:32 Sep 23 1998]
Method : TRIPTOFA [19:15:32 Sep 23 1998]
Method : TRIPTOFA [19:15:32 Sep 23 1998]

PERCENT (AREA)

PK #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	2.980	26643942	146.4288	T	35.9240	38.8151
2	5.753	47523560	230.8184	T	64.0760	61.1849

2 Peaks > Area Reject 74167504 Total Area
2 Peaks > Height Reject 377.247 Total Height

(T____38.D01) mV



***** MODEL 1020 RUNLOG for run: T____39 *****

End Time altered manually on Channel A.

File : T____39.D01
 Run : 02
 Path : C:\CHROM\T
 Collection : 19:51:15 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [19:15:32 Sep 23 1998]
 Integration: 19:51:15 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [19:15:32 Sep 23 1998]
 Report : 20:00:04 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [19:59:59 Sep 23 1998]

G.COSCO S-
 Type : Sample

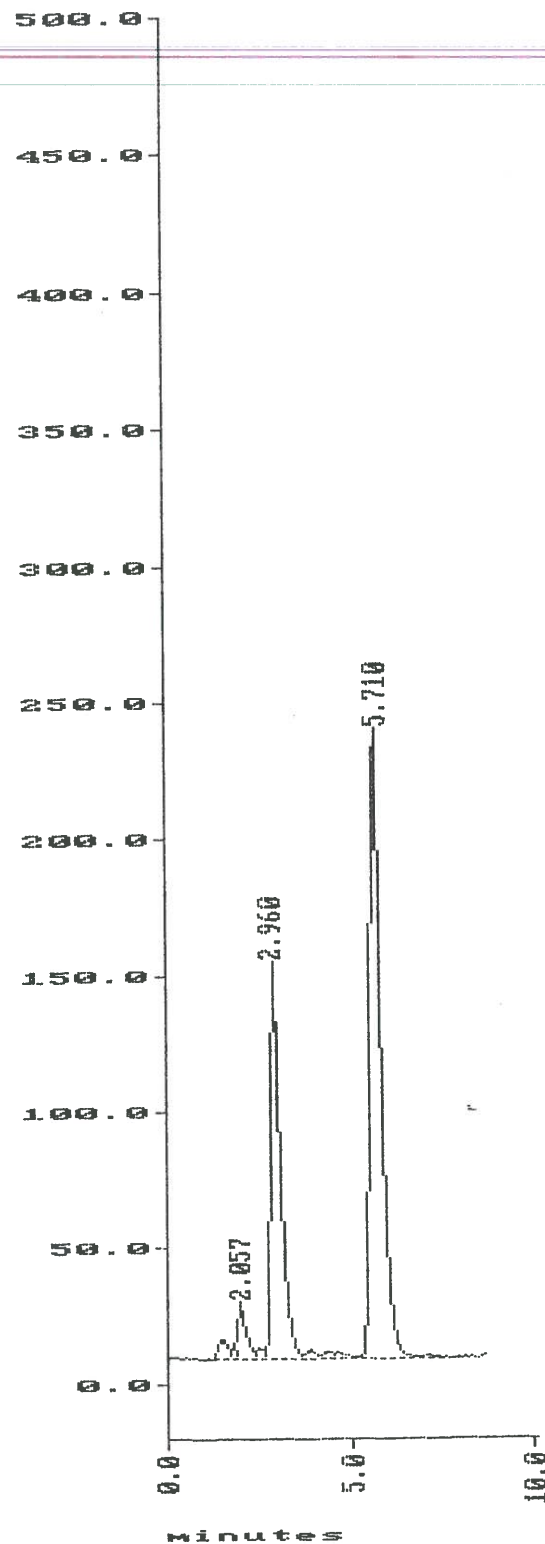
M - 70 mg

PERCENT (AREA)

Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	2.057	3548969	21.0715	T	4.5677	5.2886
2	2.960	26419732	145.9430	T	34.0038	36.6295
3	5.710	47727716	231.4153	T	61.4285	58.0818

3 Peaks > Area Reject 77696416 Total Area
 3 Peaks > Height Reject 398.430 Total Height

(T____39.D01) MW



File : T____37.D01
 Run : 02
 Path : C:\CHROM\T
 Collection : 19:31:05 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [19:15:32 Sep 23 1998]
 Integration: 19:31:05 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [19:15:32 Sep 23 1998]
 Report : 19:40:09 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [19:15:32 Sep 23 1998]

G.COSCO S.
 Type : Sample

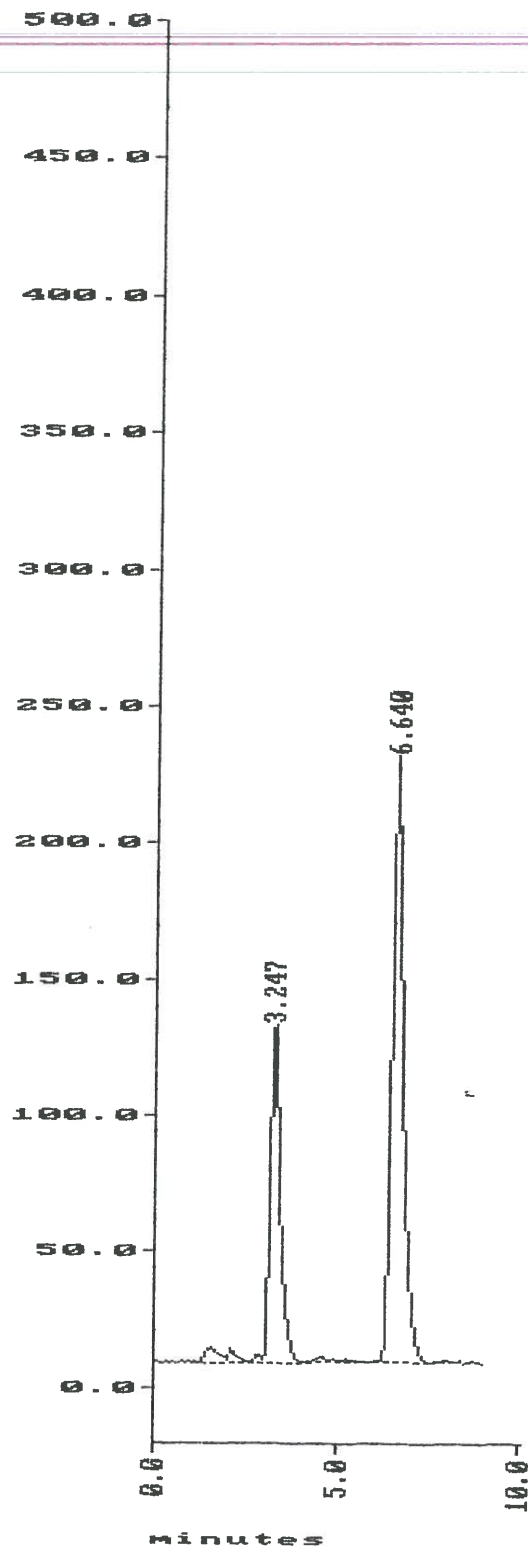
M - 60 mg

PERCENT (AREA)

PK #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	3.247	23036200	123.9162	T	32.9660	35.7272
2	6.640	46842488	222.9237	T	67.0340	64.2728

2 Peaks > Area Reject 69878688 Total Area
 2 Peaks > Height Reject 346.840 Total Height

(T____37.D01) mV



File : T____36.D01
Run : 01
Path : C:\CHROM\T

M - 60 mg

G.COSCO S.

Type : Sample

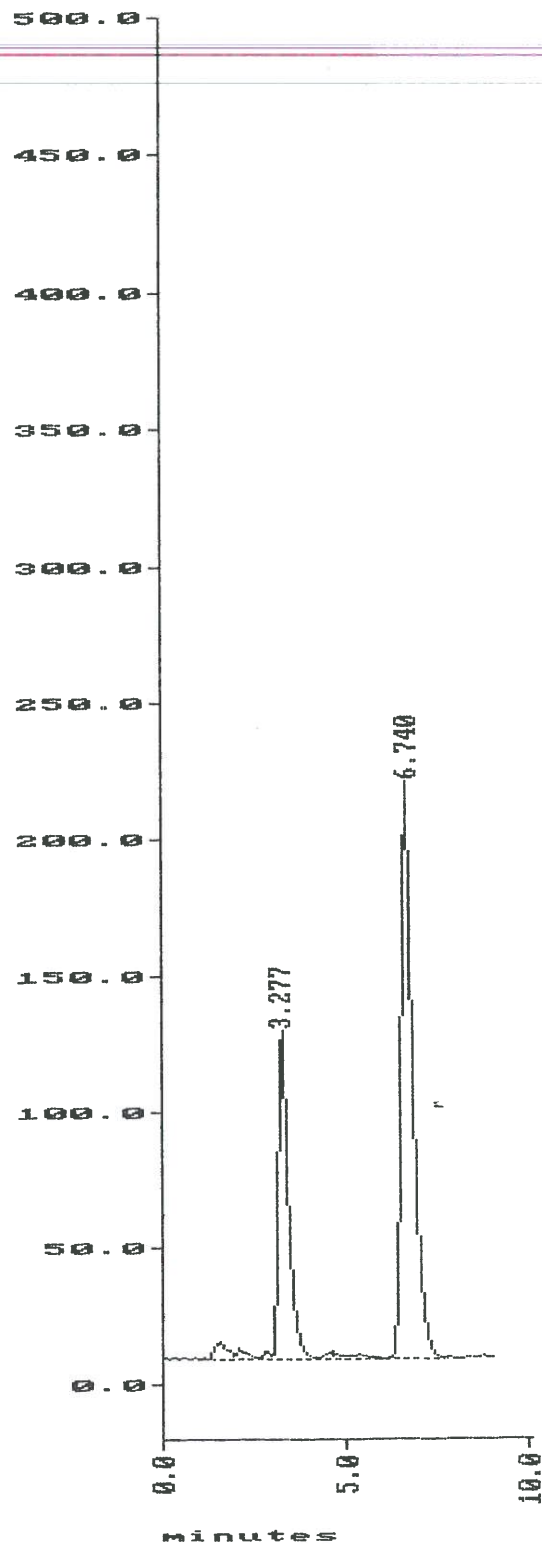
Collection : 19:17:44 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [19:15:32 Sep 23 1998]
Integration: 19:17:44 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [19:15:32 Sep 23 1998]
Report : 19:26:50 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [19:15:32 Sep 23 1998]

PERCENT (AREA)

pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	3.276	22957006	120.7279	T	32.7825	36.2803
2	6.740	47071236	212.0363	T	67.2175	63.7197

2 Peaks > Area Reject 70028240 Total Area
2 Peaks > Height Reject 332.764 Total Height

(T____36.D01) mV



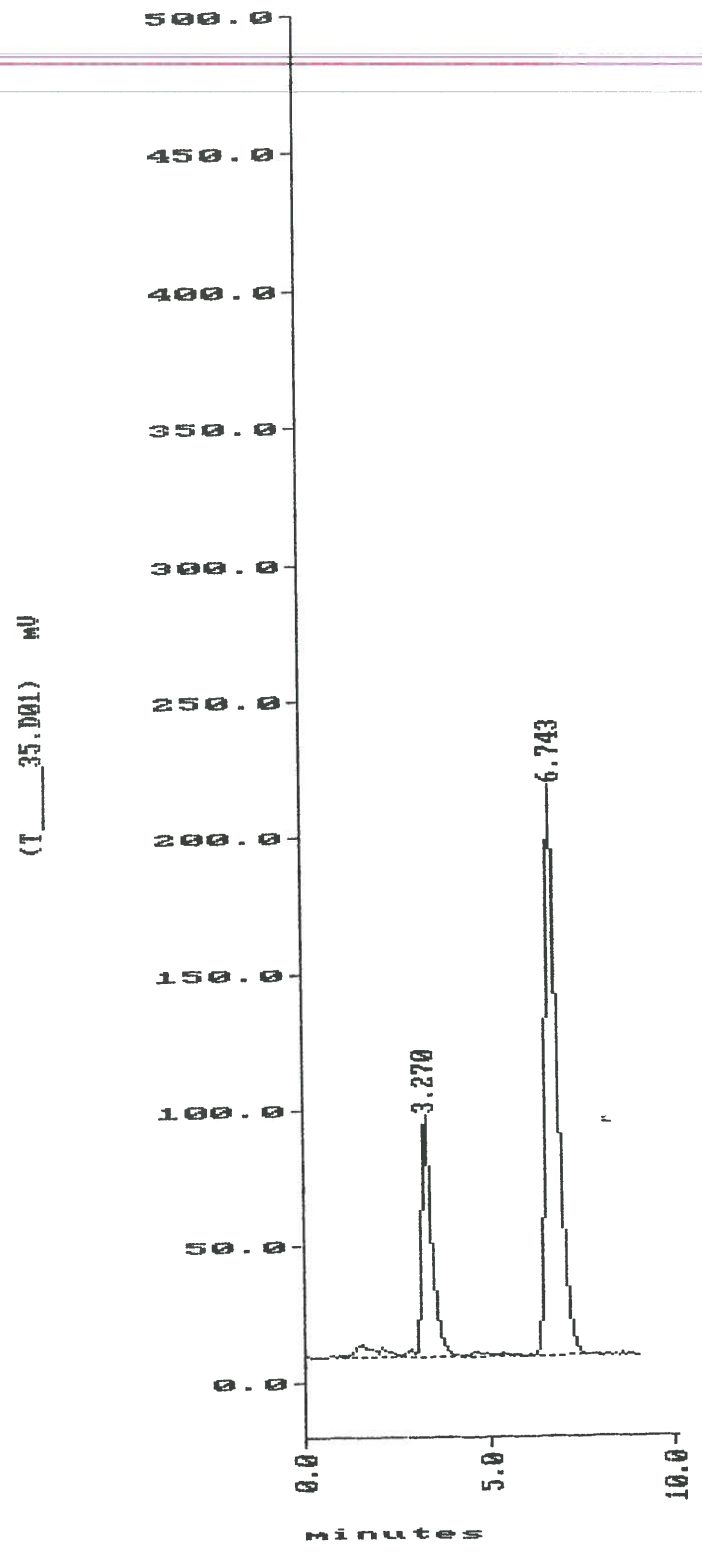
File : T____35.D01
 Run : 02
 Path : C:\CHROM\T
 Collection : 19:08:20 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [17:57:03 Sep 23 1998]
 Integration: 19:08:20 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [17:57:03 Sep 23 1998]
 Report : 19:17:24 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [19:15:32 Sep 23 1998]

M - 50 mg
 G.COSCO S.
 Type : Sample

PERCENT (AREA)

PK #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	3.270	16699348	88.7418	T	26.1374	29.7672
2	6.743	47191344	209.3774		73.8626	70.2328

2 Peaks > Area Reject 63890692 Total Area
 2 Peaks > Height Reject 298.119 Total Height



File : T____34.D01
 Run : 01
 Path : C:\CHROM\T
 Collection : 18:59:25 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [17:57:03 Sep 23 1998]
 Integration: 18:59:25 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [17:57:03 Sep 23 1998]
 Report : 19:07:29 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [17:57:03 Sep 23 1998]

M - 50 mg

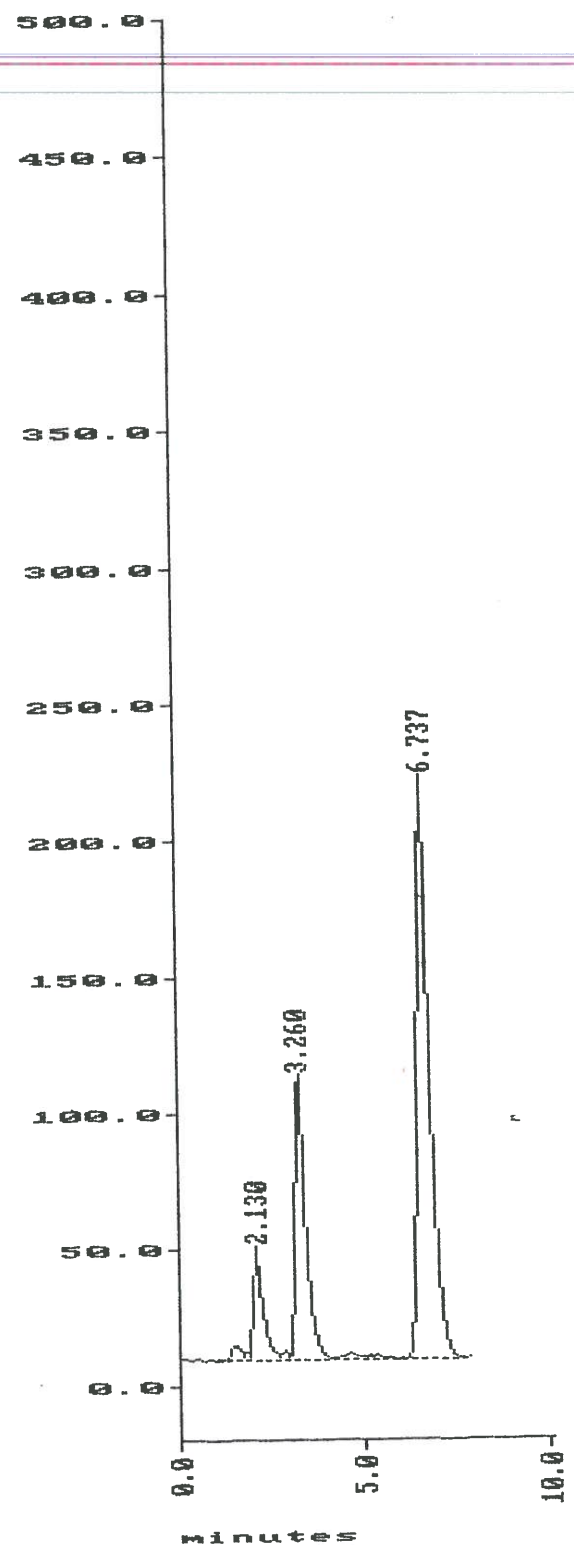
G.COSCO S-
Type : Sample

PERCENT (AREA)

Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	2.130	6989980	42.0887	T	9.2829	11.6680
2	3.260	19927906	104.6332	T	26.4648	29.0069
3	6.737	48381904	213.9961	V	64.2524	59.3250

3 Peaks > Area Reject 75299792 Total Area
 3 Peaks > Height Reject 360.718 Total Height

(T____34.D01) mV



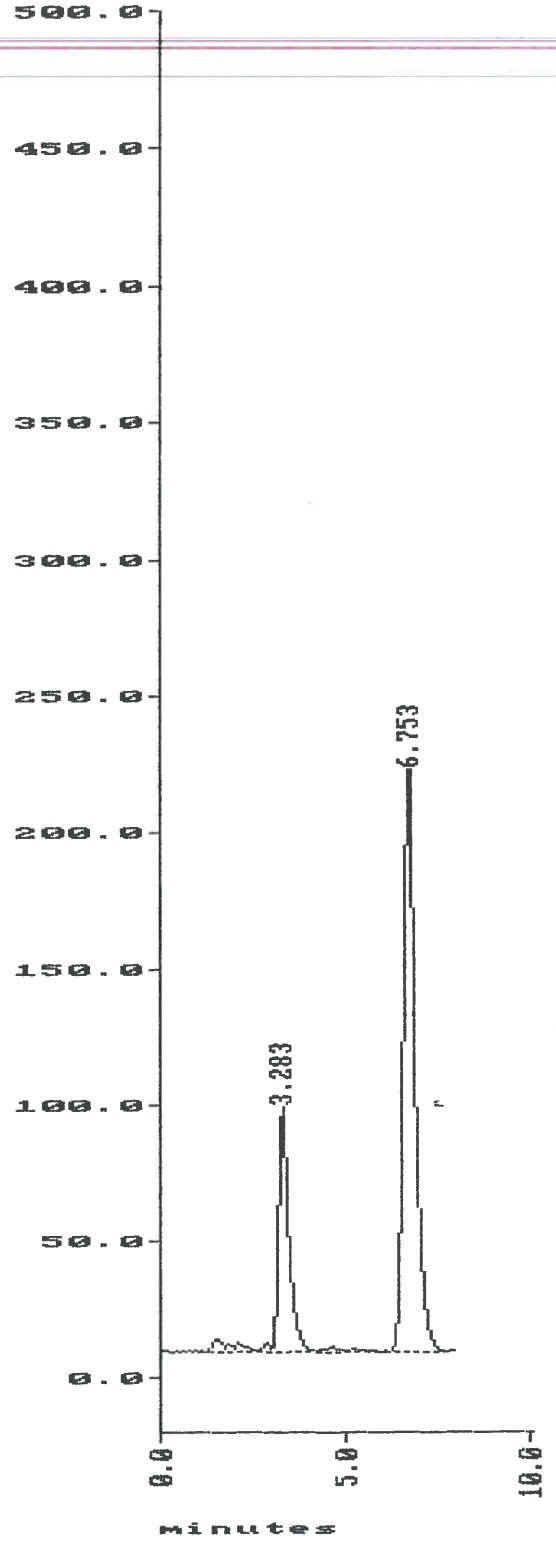
File : T____33.D01 M - 40 mg G.COSCO S.
 Run : 02 Type : Sample
 Path : C:\CHROM\T
 Collection : 18:50:30 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [17:57:03 Sep 23 1998]
 Integration: 18:50:30 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [17:57:03 Sep 23 1998]
 Report : 18:58:33 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [17:57:03 Sep 23 1998]

PERCENT (AREA)

Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	3.283	17085944	90.2911	T	26.1152	29.6919
2	6.753	48339256	213.8022	T	73.8848	70.3081

2 Peaks > Area Reject 65425200 Total Area
 2 Peaks > Height Reject 304.093 Total Height

(T____33.D01) mV



G.COSCO S.
Type : Sample

M - 40 mg

File : T_32.D01

Run : 01

Path : C:\CHROM\T

Collection : 18:41:36 Sep 23 1998

Integration : 18:41:36 Sep 23 1998

Report : 18:49:39 Sep 23 1998

Method : TRIPTOFA [17:57:03 Sep 23 1998]

Method : TRIPTOFA [17:57:03 Sep 23 1998]

Method : TRIPTOFA [17:57:03 Sep 23 1998]

PERCENT (AREA)

Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	2.137	3790788	22.8087	T	5.4887	7.0181
2	3.276	16742987	88.4681	T	24.2422	27.2211
3	6.767	48531752	213.7219	V	70.2691	65.7609

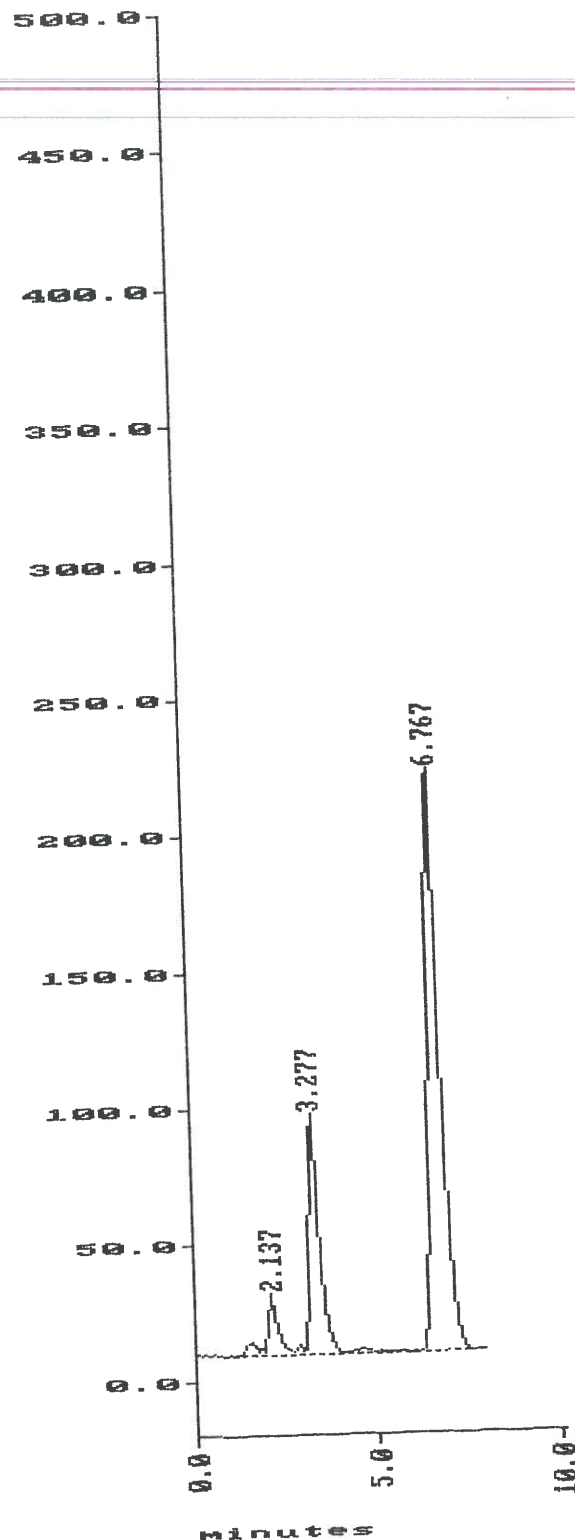
3 Peaks > Area Reject

69065528 Total Area

3 Peaks > Height Reject

324.999 Total Height

(T_32.D01) mV



File : T____31.D01 M - 30mg G.COSCO S.
 Run : 02 Type : Sample

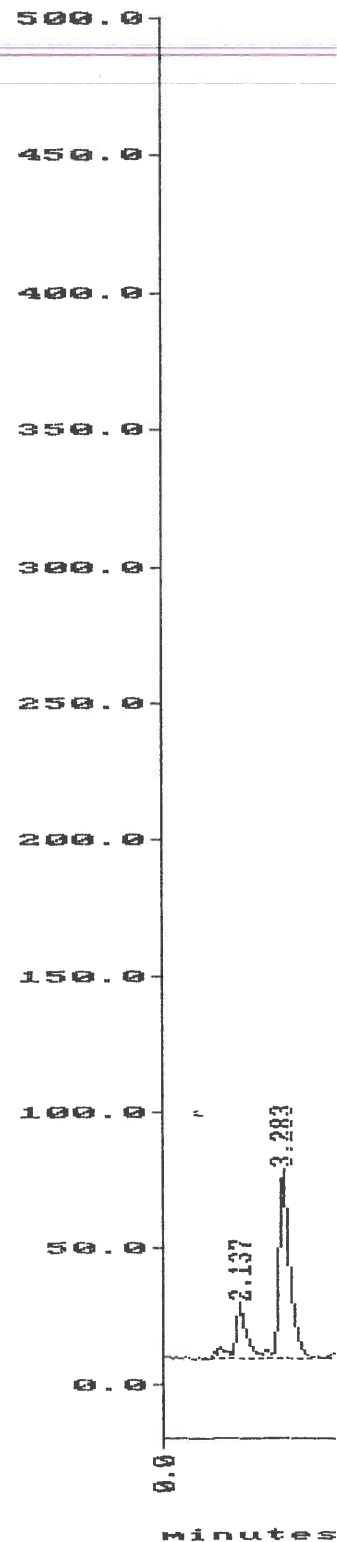
Path : C:\CHROM\T
 Collection : 18:32:42 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [17:57:03 Sep 23 1998]
 Integration: 18:32:42 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [17:57:03 Sep 23 1998]
 Report : 18:40:46 Sep 23 1998 Method : TRIPTOFA [17:57:03 Sep 23 1998]

PERCENT (AREA)

PK #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	2.137	3554008	20.5198	T	5.3560	6.6590
2	3.283	13272443	69.8653	T	20.0018	22.6722
3	6.770	49529796	217.7683	V	74.6422	70.6688

3 Peaks > Area Reject 66356248 Total Area
 3 Peaks > Height Reject 308.153 Total Height

(T____31.D01) MW



File : T____30.D01

Run : 01

Path : C:\CHROM\T

Collection : 18:23:55 Sep 23 1998

Integration: 18:23:55 Sep 23 1998

Report : 18:31:58 Sep 23 1998

M - 30mg

G.COSCO S.

Type : Sample

Method : TRIPTOFA [17:57:03 Sep 23 1998]

Method : TRIPTOFA [17:57:03 Sep 23 1998]

Method : TRIPTOFA [17:57:03 Sep 23 1998]

PERCENT (AREA)

PK #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
1	2.133	3077040	18.8349	T	4.6944	6.1474
2	3.283	13521884	71.2113	T	20.6293	23.2422
3	6.773	48948100	216.3417	V	74.6763	70.6104

3 Peaks > Area Reject

65547024 Total Area

3 Peaks > Height Reject

306.388 Total Height

33

(T____30.D01) mV

